



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C07K 14/705, 16/28, C12N 1/21, 15/12, C12P 21/02, G01N 33/68, A61K 38/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/20456</p> <p>(43) 国際公開日 2000年4月13日(13.04.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/05365</p> <p>(22) 国際出願日 1999年9月30日(30.09.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/279512 1998年10月1日(01.10.98) JP 特願平10/298667 1998年10月20日(20.10.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 渡辺卓也(WATANABE, Takuya)(JP/JP) 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9-404号 Ibaraki, (JP) 寺尾寧子(TERAOKA, Yasuko)(JP/JP) 〒305-0034 茨城県つくば市大字小野崎985番地-307号 Ibaraki, (JP)</p>		<p>福住昌司(FUKUSUMI, Shoji)(JP/JP) 〒305-0044 茨城県つくば市並木3丁目17番地6-302号 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 朝日奈忠夫, 外(ASAHI, Tadao et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF</p> <p>(54)発明の名称 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA</p> <p>(57) Abstract A human-origin G protein-coupled receptor protein or its peptide fragment or its salt, a nucleic acid encoding this receptor protein and its derivative, etc. The human hippocampus-origin G protein-coupled receptor protein or the nucleic acid encoding the same and its derivative are usable in determining a ligand (an agonist) to the G protein-coupled receptor protein, as preventives and/or remedies for diseases in association with dysfunction of the G protein-coupled receptor protein, as gene diagnostics, in a method for screening a compound capable of varying the expression dose of the G protein-coupled receptor protein or its peptide fragment, etc.</p>		

本発明はヒト由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該レセプター蛋白質をコードする核酸およびその誘導体などに関する。

本発明のヒト海馬由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはそれをコードする核酸及びその誘導体は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、遺伝子診断剤、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法などに用いることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

## 明細書

## 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNA

## 5 技術分野

本発明は、ヒト由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩およびそれをコードするDNAに関する。

## 背景技術

- 10 多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein(以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、
- 15 G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質(7TMR)と総称される。

- G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセ
- 20 プターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

- 各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。
- 25

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内に

は未だ未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質についてもサブタイプが存在するかどうかについて分かっていないものが多い。

- 5 生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、該レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

- 10 近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

- 15 従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質（即ち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（即ち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その遺伝子（例えばcDNA）をクローニングすることは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドや、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

- 25 しかし、G蛋白質共役型レセプターはその全てが見出されているわけではなく、現時点でもなお、未知のG蛋白質共役型レセプター、また対応するリガンドが同定されていない、いわゆるオーファンレセプターが多数存在しており、新たなG蛋白質共役型レセプターの探索および機能解明が切望されている。

G蛋白質共役型レセプターは、そのシグナル伝達作用を指標とする、新たな



生理活性物質（即ち、リガンド）の探索、また該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニスト）の探索に有用である。一方、生理的なりガンドが見出されなくても、該レセプターの不活化実験（ノックアウト動物）から該レセプターの生理作用を解析することにより、該レセプターに対するアゴニストまたはアンタゴニストを作製することも可能である。これら該レセプターに対するリガンド、アゴニストまたはアンタゴニストなどは、G蛋白質共役型レセプターの機能不全に関連する疾患の予防／治療薬や診断薬として活用することが期待できる。

さらにまた、G蛋白質共役型レセプターの遺伝子変異に基づく、生体での該レセプターの機能の低下または昂進が、何らかの疾患の原因となっている場合も多い。この場合には、該レセプターに対するアンタゴニストやアゴニストの投与だけでなく、該レセプター遺伝子の生体内（またはある特定の臓器）への導入や、該レセプター遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。この場合には該レセプターの塩基配列は遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために必要不可欠な情報であり、該レセプターの遺伝子は、該レセプターの機能不全に関与する疾患の予防／治療薬や診断薬に応用することもできる。

#### 発明の開示

本発明は、上記のように有用なヒト由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を提供するものである。即ち、ヒト由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）を含有するポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物、該G蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの決定方法、

- リガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られうるリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩、およびリガンドと該G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬などを提供するものである。
- 10 本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、degenerated PCR法によって作成したEST情報に基づいて、ヒト海馬由来の新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、第1～第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認され、これらのcDNAにコードされる蛋白質が
- 15 7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを確認した。本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。
- すなわち、本発明は、
- (1) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、
- 20 (2) 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：6で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、
- 25 (3) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、
- (4) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、
- (5) DNAである上記(4)記載のポリヌクレオチド、

- (6) 配列番号：2または配列番号：3で表される塩基配列を有する上記(4)記載のポリヌクレオチド、
- (7) 配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド
- 5 含有する上記(4)記載のポリヌクレオチド、
- (8) DNAである上記(7)記載のポリヌクレオチド、
- (9) 配列番号：7で表される塩基配列を有する上記(7)記載のポリヌクレオチド、
- (10) 上記(4)記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、
- 10 (11) 上記(10)記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体、
- (12) 上記(11)記載の形質転換体を培養し、上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法、
- (13) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)
- 15 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、
- (14) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記(13)記載の抗体、
- (15) 上記(13)記載の抗体を含有してなる診断薬、
- (16) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)
- 20 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド、
- (17) 上記(16)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを含有してなる医薬、
- (18) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)
- 25 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
- (19) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと上記
- (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化

させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(20) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと上記

- (1) 記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化  
5 させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(21) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(20)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

- 10 (22) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(20)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬、

- (23) 上記(4)記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下  
15 でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(24) 上記(4)記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド、

- (25) 上記(4)記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの定量  
20 方法、

(26) 上記(13)記載の抗体を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法、

- (27) 上記(25)または上記(26)記載の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能が関連する疾患の診断方法、  
25

(28) 上記(25)記載の定量方法を用いることを特徴とする、上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(29) 上記(26)記載の定量方法を用いることを特徴とする、細胞膜にお

ける上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（３０）上記（２８）記載のスクリーニング方法を用いて得られうる上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはそ

5 の塩、

（３１）上記（２９）記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、細胞膜における上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩などに関する。

（３２）蛋白質が、①配列番号：１で表わされるアミノ酸配列、配列番号：１  
10 で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～９個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：１で表わされるアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配  
15 列、③配列番号：１で表わされるアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは、１～３０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数個（１～５個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質である上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、

20 （３３）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または上記（３）記載の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする上記（１８）記載のリガンドの決定方法、

（３４）リガンドが例えばアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドＹ、  
25 オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、

ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、  
アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン (chemokine) (例えば、  
IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF  
4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、  
5 MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガ  
ストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリ  
ペプチドまたはガラニンである上記(33)記載のリガンドの決定方法、

(35) (i) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはそ  
の塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガンドとを接  
10 触させた場合と、(ii) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質も  
しくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩と、リガ  
ンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする上  
記(19)記載のスクリーニング方法、

(36) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプタ  
15 ー蛋白質もしくはその塩または上記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩  
に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を前記(1)  
記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または前記(3)記載  
の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識したリガンド  
の前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または前  
20 記(3)記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較す  
ることを特徴とするリガンドと前記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋  
白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニ  
ング方法、

(37) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプタ  
25 ー蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび  
試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細  
胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測  
定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型  
レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩の

スクリーニング方法、

(38) (i) 標識したリガンドを上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(39) (i) 標識したリガンドを上記(11)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、(ii) 標識したリガンドおよび試験化合物を上記(11)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(40) (i) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、(ii) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物および試験化合物を上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(41) 上記(1)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化する化合物を上記(11)記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場

合と、上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を活性化  
化する化合物および試験化合物を上記（１１）記載の形質転換体を培養するこ  
とによって該形質転換体の細胞膜に発現したＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質  
に接触させた場合における、Ｇ蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺  
5 激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと上記（１）記載のＧ蛋  
白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物また  
はその塩のスクリーニング方法、

（４２）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合  
物が、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グ  
10 ルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドＹ、オピオイド、プリ  
ン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、  
カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、A  
CTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル ポリ  
ペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニ  
15 ン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエ  
ン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、  
アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、G  
RO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、  
GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、  
20 MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒ  
スタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチドま  
たはガラニンである上記（４０）または（４１）記載のスクリーニング方法、

（４３）上記（３５）～（４２）記載のスクリーニング方法で得られうる、リ  
ガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との  
25 結合性を変化させる化合物またはその塩、

（４４）上記（３５）～（４２）記載のスクリーニング方法で得られうる、リ  
ガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との  
結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

（４５）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を



含有することを特徴とする上記（２０）記載のスクリーニング用キット、

（４６）上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする上記（２０）記載のスクリーニング用キット、

- 5 （４７）上記（１１）記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有することを特徴とする上記（２０）記載のスクリーニング用キット、

（４８）上記（４５）～（４７）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質または  
10 その塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

（４９）上記（４５）～（４７）記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、リガンドと上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬、

- 15 （５０）上記（１３）記載の抗体と、上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩とを接触させることを特徴とする上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

- （５１）上記（１３）記載の抗体と、被検液および標識化された上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（３）記載の部分ペプチド  
20 またはその塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（３）記載の部分ペプチドま  
25 たはその塩の定量法、および

（５２）被検液と担体上に不溶化した上記（１３）記載の抗体および標識化された上記（１３）記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載のＧ蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは上記（３）記載の部分ペプチド

またはその塩の定量法などを提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は配列番号：1で表されるアミノ酸配列をもとに作成した、本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロットを示す。

図2は配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有する本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質とMASのアミノ酸配列上の相同性比較を示す。図中、上段が本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質、下段がMASのアミノ酸配列を示す。

図3は配列番号：6で表されるアミノ酸配列と配列番号：7で表される塩基配列を示す（上段が塩基配列、下段がアミノ酸配列）（図4に続く）。

図4は配列番号：6で表されるアミノ酸配列と配列番号：7で表される塩基配列を示す（上段が塩基配列、下段がアミノ酸配列）（図3の続き）。

#### 15 発明の実施をするための最良の形態

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質（以下、レセプター蛋白質と略記する場合がある）は、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質である。

本発明のレセプター蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳

染、黒質)、脊髓、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など(特に、脳や脳の各部位)に由来するタンパク質であってもよく、また合成タンパク質であってもよい。

5 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

15 本発明の配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質として、より具体的には、例えば、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

20 実質的に同質の活性としては、例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの活性が性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

25 リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法やスクリーニング方法に従って測定することができる。

また、本発明のレセプター蛋白質としては、①配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、より好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数個(1~5個))のアミノ酸が欠失

したアミノ酸配列、②配列番号：1で表わされるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども用いられる。

本明細書におけるレセプター蛋白質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をはじめとする、本発明のレセプタータンパク質は、C末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの $\text{C}_{6-12}$ アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基もしくは $\alpha$ -ナフチルメチルなどの $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$ アルキル基などの $\text{C}_{7-14}$ アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のレセプター蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のレセプタータンパク質には、上記したタンパク質において、N末端のメチオン残基のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの $\text{C}_{2-6}$ アルカノイル基などの $\text{C}_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、

イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチルなどの $C_{2-6}$ アルカノイル基などの $C_{1-6}$ アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

- 5      本発明のレセプター蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト由来（より好ましくはヒト海馬由来）のレセプター蛋白質などが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）としては、上記した本発明のレセプター蛋白質の部分ペプチドで  
10      あれば何れのものであってもよいが、例えば、本発明のレセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位であって、レセプター結合活性を有するものなどが用いられる。

具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有するレセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、図1で示される疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用  
15      いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

本発明の部分ペプチドのアミノ酸の数は、上記した本発明のレセプター蛋白質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、  
20      より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を示す。

25      ここで、「実質的に同質の活性」とは、上記と同意義を示す。「実質的に同質の活性」の測定は上記と同様に行なうことができる。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～

20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

- 5      また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、上記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。

- さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のレセプター蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。
- 10

- また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、上記した本発明のタンパク質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）であってもよい。
- 15

- 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、酸または塩基との生理学的に許容される塩が挙げられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。
- 20

- 25      本発明のレセプター蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のレセプター蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のタンパク質合成法またはこれに準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

- 5     本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-
- 10    ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げるることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知
- 15    の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそのアミド体を取得する。

- 20    上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt、HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂
- 25    に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メ

チルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニヒドリ反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられ



る。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが用いられる。

- 5 ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、  
10 2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般  
15 に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除  
20 去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保

護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

- タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側に
- 5 ペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保
- 10 護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。

- タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、
- 15 タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

- 本発明のタンパク質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、
- 20 固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のタンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- 25 ①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の前製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマト  
5 グラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述し  
10 た本発明のレセプター蛋白質をコードする塩基配列（DNAまたはRNA、好ましくはDNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA：RNAのハイブリッド  
15 でもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（即ち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（即ち、非コード鎖）であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリー  
20 ーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotal RNAまたはmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

25 具体的には、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：7で表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：2、配列番号：3または配列番号：7で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド

結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有するレセプター蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

配列番号：2、配列番号：3または配列番号：7で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：3または配列番号：7で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

また、後述の実施例1～3から明らかなとおり配列番号：2、配列番号：3、配列番号：7で表わされる塩基配列を含有するDNAの存在は、遺伝的多型性（ポリモルフィズム）を示唆し、この多型性を利用することにより、後述の診断薬などの応用を可能たらしめる。

ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40mM、好ましくは約19～20mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：2または配列番号：3で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を含有するレセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：7で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNA

をも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができる、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAとの相互作用を介してG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、及び該G蛋白質共役型レセプター蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いれば、自体公知の方法に従い生体内及び生体外で該G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現量の測定や調節（必要に応じ、過剰発現の制御や発現増強など）を行うことができる。即ち、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の欠損症や機能不全に関連する疾患の診断、予防または／および治療に有用である。上記の用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンδροーム領域、及び3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるといえることができる。アンチセンス・ポリヌクレオチ

ドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（又は非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 $\alpha$ アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に

変換されていてよい。

- 本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシド
- 5 アミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチ
- 10 センス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており。例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp. 247, 1992; Vol. 8, pp. 395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

- 15 本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との
- 20 相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオ
- 25 シド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基

の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。

- アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸其れ自体公知の各種の方法
- 5 で細胞に適用できる。

- 本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記した細胞・組織由来のcDNA、上記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNA
- 10 NAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

- 15 具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、
- (1) 配列番号：2、配列番号：3または配列番号：7で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または(2) 配列番号：2、配列番号：3または配列番号：7で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のレセプター蛋白質
- 20 ペプチドと実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するレセプター蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

- 配列番号：2、配列番号：3または配列番号：7で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：2、配列番号：3または
- 25 は配列番号：7で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド(以下、本発明のレセプター蛋白質と略記する)を完全にコードするDNAのクローニングの手段とし



ては、本発明のレセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のレセプター蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モ  
5 レキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

- 10 DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-G (宝酒造 (株))、Mutan<sup>TM</sup>-K (宝酒造 (株)) などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたレセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用  
15 することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のレセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のレセ  
20 プター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用い  
25 られる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。

これらのうち、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ P<sub>L</sub>プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr<sup>-</sup>）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のレセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフ

エロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、

5 昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. US A), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティクス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

15 バチルス属菌としては、例えば、バチルス・ズブチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20 OB-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC

CRL1711)、S f 2 1細胞(以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ(In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー(Nature), 315巻, 592(1985)〕。

- 5 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr<sup>-</sup>)細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

- 10 エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・  
15 ジェネラル・ジェネティックス(Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユー  
20 エスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー(Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なうことができる。

- 25 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコール, 263-267(1995)(秀潤社発行)、ヴィロロジー(Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

- 10 エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

- 20 宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)〕や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)〕が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T. C. C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した 10% ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地の pH は約 6.2 ~ 6.4 に調整するのが好ましい。培養は通常約 27℃

5 で約 3 ~ 5 日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約 5 ~ 20% の胎児牛血清を含む MEM 培地 [サイエンス (Science), 122 巻, 501 (1952)], DMEM 培地 [ヴィロロジー (Virology), 8 巻, 396 (1959)], RPMI 1640 培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・  
10 メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199 巻, 519 (1967)], 199 培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73 巻, 1 (1950)] などが用いられる。pH は約 6 ~ 8 であるのが好ましい。培養は通常約 30℃ ~  
15 40℃ で約 15 ~ 60 時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のレセプター蛋白質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

20 本発明のレセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりレセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性  
25 剤や、トリトン X-100™ などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にレセプター蛋白質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるレセプター蛋白質の精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことが

できる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるレセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するレセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のレセプター蛋白質またはその塩の活性は、標識したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

20 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

25 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のレセプター蛋白質等と略記することもある）に対する抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のレセプター蛋白質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10  
5 回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に  
10 脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化レセプター蛋白質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーと  
15 ミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁(1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げ  
20 られるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

25 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、レセプター蛋白質等の抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）



またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したレセプター蛋白質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

- 5      モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、
- 10      日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイ
- 15      ブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### （b）モノクローナル抗体の精製

- モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点
- 20      沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

#### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

- 25      本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（レセプター蛋白質等の抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより

製造できる。

哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、  
5    どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、  
10    チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。  
15    投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチドまたはその塩、および該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAは、  
25    (1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、(2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤、(3) 遺伝子診断剤、(4) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(5) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチド

の発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、

(6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法、

(7) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法、(8)

- 5 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニスト)を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、(9) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量、(10) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法、(11) 細胞
- 10 膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、(12) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による中和、(13) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製などに用いることができる。

- 15 特に、本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターに対するリガンドの結合性を変化させる化合物(例、アゴニスト、アンタゴニストなど)をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用するこ
- 20 とができる。

- 本発明のレセプター蛋白質もしくは部分ペプチドまたはその塩(以下、本発明のレセプタータンパク質等と略記する場合がある)、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNA(以下、本発明のDNAと略記する場合がある)および本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体(以下、
- 25 本発明の抗体と略記する場合がある)の用途について、以下に具体的に説明する。

(1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド(アゴニスト)の決定

本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもし

くはその塩は、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド（アゴニスト）を探索し、または決定するための試薬として有用である。

- すなわち、本発明は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、試験化合物とを接触させることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パankレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログアストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パankレアティックポリペプチドまたはガラニンなど）の他に、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のレセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得ることができる。

- 具体的には、本発明のリガンド決定方法は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP

生成、細胞内 c G M P 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o s 活性化、p H の低下などを促進する活性または抑制する活性) を有する化合物 (例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など) またはその塩を決定する方法である。

- 5      本発明のリガンド決定方法においては、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば、該レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

- 10      ① 標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
- 15      ② 標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法、
- 20      ③ 標識した試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該レセプター蛋白質またはその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、
- 25      ④ 試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $C a^{2+}$  遊離、細胞内 c A M P 生成、細胞内 c G M P 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c - f o s の活性化、p H の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩

に対するリガンドの決定方法、および

- ⑤試験化合物を、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラ
- 5 キドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とする本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

- 10 特に、上記①～③の試験を行ない、試験化合物が本発明のレセプター蛋白質に結合することを確認した後に、上記④～⑤の試験を行なうことが好ましい。

- まず、リガンド決定方法に用いるレセプター蛋白質としては、上記した本発明のレセプター蛋白質または本発明の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたレセプター蛋白質
- 15 質が適している。

- 本発明のレセプター蛋白質を製造するには、前述の発現方法が用いられるが、該レセプター蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には、通常、相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるもの
- 20 ではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス（nuclear polyhedrosis virus；NPV）のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、
- 25 サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献〔Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 267巻, 19555～19559頁, 1992

年]に記載の方法に従って行うことができる。

したがって、本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いてもよい。

本発明のリガンド決定方法において、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

10 本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞としては、本発明のレセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm~3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm~30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

25 該レセプター蛋白質を含有する細胞やその膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の

①～③の方法を実施するためには、適当なレセプター蛋白質画分と、標識した試験化合物が必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター画分などが望ましい。ここで、

- 5 同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識した試験化合物としては、 $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識したアンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、  
10 トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、  
15 エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、  
20 パンクレアティックポリペプチドまたはガラニンなどが好適である。

具体的には、本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法を行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アドラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プ



ロテアーゼによるリセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイ  
ペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ  
阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、  
一定量（5000cpm~500000cpm）の $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量（N  
5 SB）を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意  
する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分か  
ら24時間、望ましくは約30分から3時間行なう。反応後、ガラス繊維濾紙  
等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放  
10 射活性を液体シンチレーションカウンターあるいはγ-カウンターで計測する。  
全結合量（B）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（B-NSB）  
が0cpmを越える試験化合物を本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対  
するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドを決定する上記の  
15 ④~⑤の方法を実施するためには、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性  
（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離、細胞  
内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位  
変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進  
する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを  
20 用いて測定することができる。具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有す  
る細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっ  
ては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交  
換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出  
あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。  
25 細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞  
が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を  
添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性につ  
いては、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に  
対する産生抑制作用として検出することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合するリガンド決定用キットは、本発明のレセプター蛋白質もしくはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはその塩、本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものである。

- 5 本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

- 10 孔径0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

- 15 本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

③標識試験化合物

市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの

- 20 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu\text{M}$ に希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

④非標識試験化合物

標識化合物と同じものを100~1000倍濃い濃度に調製する。

2. 測定法

- 25 ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu\text{l}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5  $\mu\text{l}$ 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5  $\mu\text{l}$ 加えておく。

③反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2 N NaOH-1% SDSで溶解し、4 ml の液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

本発明のレセプター蛋白質またはその塩に結合することができるリガンドとしては、例えば、脳、下垂体、脾臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的には、アンギオテンシン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、PACAP、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、アドレノメジュリン、ソマトスタチン、GHRH、CRF、ACTH、GRP、PTH、VIP（バソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ポリペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーテッドペプチド）、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -ケモカイン（chemokine）（例えば、IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど）、エンドセリン、エンテログストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニンなどが用いられる。

（2）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤

上記（1）の方法において、本発明のレセプター蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAを、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

例えば、生体内において本発明のレセプター蛋白質が減少しているためにリ

ガンドの生理作用が期待できない（該レセプター蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明のレセプター蛋白質を該患者に投与し該レセプター蛋白質の量を補充したり、②（イ）本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を十分に発揮させることができる。即ち、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として有用である。

本発明のレセプター蛋白質は、G蛋白共役型レセプター蛋白質の一種であるMASとアミノ酸配列レベルで約30%の相同性が認められる。MAS遺伝子欠損マウスに不安の昂進等の中枢機能の変化が認められたとの報告〔J. B. C., 273 (No. 19), 11867-11873 (1998)〕があることから、MAS遺伝子は中枢機能発現に何らかのはたらきがあると考えられる。従って、MASと相同性が認められる本発明のレセプター蛋白質は、中枢機能の不全に関連する疾患（例えば、不安症、分裂病、躁鬱病、痴呆症、精神遅滞および運動障害を包含する精神病など）の予防および／または治療に有用である。ラットのMAS遺伝子の発現が生後直後に末梢の種々の臓器で高い発現を示し、成熟後は中枢以外では精巣で高い発現を示すとの報告〔FEBS Lett. 357:27-32 (1995)〕があることから、細胞の増殖・機能の獲得および生殖に重要な役割があると考えられる。従って、MASと相同性が認められる本発明のレセプター蛋白質は、呼吸器疾患・循環器疾患・消化管疾患・肝/胆/脾疾患・内分泌疾患の予防および／または治療に有用である。

本発明のレセプター蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、

アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

- 5      例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター蛋白質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のレセプター蛋白質または②該レセプター
- 10   蛋白質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。
- 15   錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような
- 20   香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、
- 25   ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80™、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、

ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明のレセプター蛋白質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。

他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1 mg～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

### (3) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、  
5    AまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、  
該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたは  
はmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザン  
ハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス（Genomics）,  
10    第5巻、874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナ  
ショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユーエスエー（Proceedings  
of the National Academy of Sciences of the United States of America）,  
第86巻、2766～2770頁（1989年））などにより実施することが  
できる。

### 15    (4) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明のDNAは、プローブとして用いることにより、本発明のレセプター  
蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニング  
に用いることができる。

20    すなわち本発明は、例えば、(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、  
③臓器から単離した組織もしくは細胞、または(ii) 形質転換体等に含まれる  
本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を測定すること  
による、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化  
させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

25    本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量の測定は具  
体的には以下のようにして行なう。

(i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウ  
サギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラッ  
ト、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、

抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。

- 5 得られた細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAは、例えば、通常の方法により細胞等からmRNAを抽出し、例えばTaqManPCRなどの手法を用いることにより定量することができ、自体公知の手段によりノザンプロットを行うことにより解析することもできる。

- (ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNAを同様にして定量、解析することができる。

本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物のスクリーニングは、

- 15 (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは30分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレス  
20 と同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、細胞に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができ、

- (ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、  
25 一定時間培養後（1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3日後）、該形質転換体に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドのmRNA量を定量、解析することにより行なうことができる。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、本発



明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を増加させることにより、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、

(ロ) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。

- 10 該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 15 該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

- 25 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、

例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

- 5 (5) 本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

本発明のレセプター蛋白質は前述のとおり、例えば中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの発現量を変化させる化合物は、本発明のレセ  
10 プター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

- 15 例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に  
20 認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル  
25 ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のため

の無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マ  
5 ニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、  
10 ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロ  
15 カインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防  
止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

20 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kg として）においては、一日につき約 0.1～100 mg、好ましくは約 1.0～50 mg、より好ましくは約 1.0～20 mg である。非経口的に投与する場合は、その  
1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、  
25 例えば、注射剤の形では通常成人（60 kg として）においては、一日につき約 0.01～30 mg 程度、好ましくは約 0.1～20 mg 程度、より好ましくは約 0.1～10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

（6）本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

本発明のレセプター蛋白質等は、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。

本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のレセプター蛋白質等と接触させること  
5 によって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

10 (7) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング方法

本発明のレセプター蛋白質等を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質等の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いること  
15 によって、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を变化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。

このような化合物には、（イ）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜  
20 電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、（ロ）該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、（ハ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化  
25 合物、あるいは（ニ）リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる（なお、上記（イ）の化合物は、上記したリガンド決定方法によってスクリーニングすることが好ましい）。

すなわち、本発明は、（i）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドとを接触させた場合と（ii）本発明のレセプ

ター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩と、リガンドおよび試験化合物とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 5      本発明のスクリーニング方法においては、(i)と(ii)の場合における、例えば、該レセプター蛋白質等に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

- ①標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 10      ②標識したリガンドを、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 15      ③標識したリガンドを、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質等に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、標識したリガンドの該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 20      ④本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物
- 25

- および試験化合物を本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、
- 5 c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および
- ⑤本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物（例えば、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドなど）を本発明のDNAを含有する形質転換体
- 10 を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合と、本発明のレセプター蛋白質等を活性化する化合物および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のレセプター蛋白質等に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、
- 15 細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。
- 20 本発明のレセプター蛋白質等が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を得て（一次スクリーニング）、その後に該候補化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか
- 25 否かを確認する試験（二次スクリーニング）が必要であった。細胞、組織または細胞膜画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングすることは困難であった。

しかしながら、例えば、本発明のヒト由来レセプター蛋白質を用いることに

よって、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

5 本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明のレセプター蛋白質等としては、上記した本発明のレセプター蛋白質等を含有するものであれば何れのものであってもよいが、本発明のレセプター蛋白質等を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたヒト由来のレセプター蛋白質等などが適している。

10

本発明のレセプター蛋白質等を製造するには、前述の方法が用いられるが、本発明のDNAを哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献[Nambi, P.ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267

15

20

25

巻, 19555~19559頁, 1992年]に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質等であってもよいし、該レセプター蛋白質等を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質  
5 等を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーや  
10 リトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清を  
15 さらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質等を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子である  
20 のが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする上記の①～③を実施するためには、例えば、適当なレセプター  
25 蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。



標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば  $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  などで標識されたリガンドなどが用いられる。

具体的には、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まず本発明のレセプター蛋白質等を含む細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくはpH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量（5000cpm～500000cpm）の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-4}\text{M}$ ～ $10^{-10}\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ $B_0$ ）から非特異的結合量（NSB）を引いたカウント（ $B_0 - \text{NSB}$ ）を100%とした時、特異的結合量（ $B - \text{NSB}$ ）が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物スクリーニングする上記の④～⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊

離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

- 5      具体的には、まず、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性
- 10    の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

- 15    細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のレセプター蛋白質等を発現した細胞としては、天然型の本発明のレセプター蛋白質等を有する細胞株、前述の組換え型レセプター蛋白質等を発現した細胞株などが望ましい。

- 20    試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

- 25    リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明のレセプター蛋白質等、本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞、または本発明のレセプター蛋白質等を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

5 ②G蛋白質共役型レセプター標品

本発明のレセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

- 10 市販の [<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識したリガンド 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu\text{M}$ に希釈する。

④リガンド標準液

- 15 リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

- ①12穴組織培養用プレートにて培養した本発明のレセプター蛋白質発現CHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490  $\mu\text{l}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。
- 20 ② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5  $\mu\text{l}$ 加えた後、標識リガンドを5  $\mu\text{l}$ 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに $10^{-3}$ Mのリガンドを5  $\mu\text{l}$ 加えておく。
- ③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA (和光純薬製) と混合する。
- 25 ④液体シンチレーションカウンター (ベックマン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式で求める。

$$\text{PMB} = [ (B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB}) ] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

5

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドと本発明のレセプター蛋白質等との結合性を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアゴニスト）、(ロ) 該細胞刺激活性を有しない化合物（いわゆる、本発明のレセプター蛋白質に対するアンタゴニスト）、(ハ) リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物、あるいは(ニ) リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のレセプター蛋白質等に対するアンタゴニストは、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を増強する化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等に対するリガンドが有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

5 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

10 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、  
15 より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他  
20 の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

（8）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

25 本発明のレセプター蛋白質は前述のとおり、例えば中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、本発明のレセプター蛋白質とリガンドとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

び／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外  
5 外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容  
10 量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサ  
15 ッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マ  
20 ニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80<sup>TM</sup>、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロ

カインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

- 5      このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

- 該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60 kgとして)において、一日につき約0.1~100 mg、好ましくは約1.0~50 mg、  
10      より好ましくは約1.0~20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人(60 kgとして)においては、一日につき約0.01~30 mg程度、好ましくは約0.1~20 mg程度、より好まし  
15      くは約0.1~10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kgあたりに換算した量を投与することができる。

(9) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量

- 本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量、特にサンドイッチ  
20      免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化レセプター蛋白質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化レセプター蛋白質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法、

- 25      (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のレセプター蛋白質等の定量法を提供する。

上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のN端部

を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のレセプター蛋白質等のC端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明のレセプター蛋白質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のレセプター蛋白質  
5 等の測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a b')<sub>2</sub>、F a b'、あるいはF a b画分を用いてもよい。本発明のレセプター蛋白質等に対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、レセプター蛋白質量）に対応した抗体、抗原もしくは  
10 は抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

15 標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>Cなどが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、  
20 リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

25 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。



サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のレセプター蛋白質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるレセプター蛋白質等の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はレセプター蛋白質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、レセプター蛋白質のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（Ｆ）と抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの

相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメ

5 トリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のレセプター蛋白質またはその塩の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細に

10 ついては、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)

15 (医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモノジー (Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part

20 E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。

以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のレセプター蛋白質またはその塩を感度良く定量することができる。

25 さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のレセプター蛋白質またはその塩を定量することによって、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のレセプター蛋白質等を特異的に検出するために使用することができる。また、本発

明のレセプター蛋白質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のレセプター蛋白質等の検出、被検細胞内における本発明のレセプター蛋白質の挙動の分析などのために使用することができる。

- (10) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法

本発明の抗体は、本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を特異的に認識することができるので、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングに用いることができる。

- 10 すなわち本発明は、例えば、

(i) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化

- 15 合物のスクリーニング方法、

(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を破壊した後、細胞膜画分を単離し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物

- 20 のスクリーニング方法、

(iii) 非ヒト哺乳動物の①血液、②特定の臓器、③臓器から単離した組織もしくは細胞等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質または

- 25 その部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

(iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を切片とした後、免疫染色法を用いることにより、細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することによる、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその

部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの定量は具体的には以下のようにして行なう。

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、
- 10 または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、例えば、適当な緩衝液（例えば、トリス塩酸緩衝液、リン酸緩衝液、ヘペス緩衝液など）等に懸濁し、臓器、組織あるいは細胞を破壊し、界面活性剤（例えば、トリトンX100<sup>TM</sup>、ツイーン20<sup>TM</sup>など）などを用い、さらに遠心分離や濾過、カラム分画などの手法を用いて細胞膜画分を得る。
- 15 細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500 rpm～3000 rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000 rpm～30000 rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質等と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。
- 20 25

細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、例えば、本発明の抗体を用いたサンドイッチ免疫測定法、ウエスタンブロット解析などにより定量することができる。

かかるサンドイッチ免疫測定法は前述の方法と同様にして行なうことができ、

ウエスタンブロットは自体公知の手段により行なうことができる。

(ii) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体を前述の方法に従い作製し、細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドを定量することができる。

- 5 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物のスクリーニングは、

- (i) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物に対して、薬剤あるいは物理的ストレスなどを与える一定時間前（30分前ないし24時間前、好ましくは30分前ないし12時間前、より好ましくは1時間前ないし6時間前）もしくは
- 10 一定時間後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、または薬剤あるいは物理的ストレスと同時に被検化合物を投与し、投与後一定時間経過後（30分後ないし3日後、好ましくは1時間後ないし2日後、より好ましくは1時間後ないし24時間後）、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量
- 15 することにより行なうことができ、

(ii) 形質転換体を常法に従い培養する際に被検化合物を培地中に混合させ、一定時間培養後（1日後ないし7日後、好ましくは1日後ないし3日後、より好ましくは2日後ないし3日後）、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を定量することにより行なうことができる。

- 20 細胞膜画分に含まれる本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの確認は具体的には以下のようにして行なう。

- (iii) 正常あるいは疾患モデル非ヒト哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど、より具体的には痴呆ラット、肥満マウス、動脈硬化ウサギ、担癌マウスなど）に対して、薬剤（例えば、
- 25 抗痴呆薬、血圧低下薬、抗癌剤、抗肥満薬など）あるいは物理的ストレス（例えば、浸水ストレス、電気ショック、明暗、低温など）などを与え、一定時間経過した後に、血液、あるいは特定の臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓など）、または臓器から単離した組織、あるいは細胞を得る。得られた臓器、組織または細胞等を、常法に従い組織切片とし、本発明の抗体を用いて免疫染色を行う。

細胞表層での該受容体タンパク質の染色度合いを定量化することにより、細胞膜上の該タンパク質を確認することにより、定量的または定性的に、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を確認することができる。

- 5 (iv) 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドを発現する形質転換体等を用いて同様の手段をとることにより確認することもできる。

- 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、(イ) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を増加させることにより、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を増強させる化合物、(ロ) 細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を減少させることにより、該細胞刺激活性を減弱させる化合物である。
- 10
- 15

- 該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。
- 20

該細胞刺激活性を増強させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を増強するための安全で低毒性な医薬として有用である。

該細胞刺激活性を減弱させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質等の生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

- 25 本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のレセプター蛋白質を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

（11）細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物を含有する各種疾病の予防および／または治療剤

15 本発明のレセプター蛋白質は前述のとおり、例えば中枢機能など生体内で何らかの重要な役割を果たしていると考えられる。従って、細胞膜における本発明のレセプター蛋白質またはその部分ペプチドの量を変化させる化合物は、本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として用いることができる。

20 該化合物を本発明のレセプター蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容

量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート 80™、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）に



においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき

5 約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

（12）本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体による中和

10 本発明のレセプター蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に対する抗体が、それらレセプター蛋白質などに対する中和活性とは、即ち、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該レセプター蛋白質の関与するシグナル伝達、例えば、該レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキ

15 ドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。従って、該レセプター蛋白質の過剰発現などに起因する疾患の予防および／または治療に用いることができる。

20

（13）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製

本発明のDNAを用いて、本発明のレセプター蛋白質等を発現するトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。非ヒト動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）など（以下、動物と略記する）が挙げられるが、特に、マウス、ウサギ

25

などが好適である。

本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用

いるのが一般に有利である。例えば、ウサギ由来の本発明のDNAを転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明のDNAを動物細胞で発現させる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、ウサギ受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター

5 蛋白質等を高産生するDNA転移動物を作成できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現するNGF遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

受精卵細胞段階における本発明のDNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のレセプター蛋白質等が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のレセプター蛋白質等を有する。

10

15 本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

20

本発明のDNAが転移された動物は、本発明のレセプター蛋白質等が高発現させられているので、本発明のレセプター蛋白質等に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することも

25 できる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のレセプター蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のレセプター蛋白質等について分析することができる。本発明のレセプター蛋白質等を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由

来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。  
また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような  
医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明の  
レセプター蛋白質等を単離精製することも可能である。

- 5     本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、  
IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あ  
るいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。ま  
たアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示  
すものとする。

10	DNA	: デオキシリボ核酸
	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	A	: アデニン
	T	: チミン
	G	: グアニン
15	C	: シトシン
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
20	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
	SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
25	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン

	S e r	: セリン
	T h r	: スレオニン
	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
5	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
10	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
15	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸
	M e	: メチル基
	E t	: エチル基
	B u	: ブチル基
20	P h	: フェニル基
	T C	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

	T o s	: p -トルエンスルフォニル
25	C H O	: ホルミル
	B z l	: ベンジル
	C l <sub>2</sub> Bzl	: 2, 6 -ジクロロベンジル
	B o m	: ベンジルオキシメチル
	Z	: ベンジルオキシカルボニル

- C l - Z : 2-クロロベンジルオキシカルボニル  
 B r - Z : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル  
 B o c : t-ブトキシカルボニル  
 D N P : ジニトロフェノール  
 5 T r t : トリチル  
 B u m : t-ブトキシメチル  
 F m o c : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル  
 H O B t : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール  
 H O O B t : 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-  
 10 1,2,3-ベンゾトリアジン  
 H O N B : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド  
 D C C : N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕

- 15 本発明のヒト海馬由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質H7 TMB 5 6  
 のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト海馬由来新規  
 G蛋白質共役型レセプター蛋白質H7 TMB 5 6をコードするcDNAの塩基

- 20 配列を示す。

〔配列番号：3〕

配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト海馬由来新規  
 G蛋白質共役型レセプター蛋白質H7 TMB 5 6をコードするcDNAの塩基  
 配列を示す。

- 25 〔配列番号：4〕

本発明のヒト海馬由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質H7 TMB 5 6  
 をコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー1の塩基  
 配列を示す。

〔配列番号：5〕

本発明のヒト海馬由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質H7TMB56をコードするcDNAをクローニングするために使用したプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕

- 5 本発明のヒト海馬由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質H7TMB56Cのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：7〕

配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAの塩基配列を示す。

- 10 後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia coli)DH5 $\alpha$ /pCRII-H7TMB56は、平成10年9月4日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERMBP-6483として、平成10年6月19日から財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO16186として寄託されている。
- 15 以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング(Molecular cloning)に記載されている方法に従った。

- 実施例1 ヒト海馬由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする  
20 cDNAのクローニングと塩基配列の決定(1)

- ヒト海馬cDNA(Marathon-Ready<sup>TM</sup> cDNA、CLONTECH社)を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1(配列番号：4)およびプライマー2(配列番号：5)を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH社)  
25 1/50量、プライマー1(配列番号：4)およびプライマー2(配列番号：5)を各0.2 $\mu$ M、dNTPs 200 $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを加え、25 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、①95 $^{\circ}$ C・1分の後、②94 $^{\circ}$ C・20秒、72 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを3回、③94 $^{\circ}$ C・20秒、68 $^{\circ}$ C・

2分のサイクルを3回、④ 94℃・20秒、63.5℃・20秒、68℃・2分20秒のサイクルを38回繰り返し、⑤ 最後に68℃・7分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpCRII(Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列(配列番号:2および配列番号:3)を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列(配列番号:1)を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をH7TMB56と命名した。

本発明のヒト海馬由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質H7TMB56をコードするcDNA(配列番号:2)がサブクローニングされたプラスミドpCRII-H7TMB56を、自体公知の方法に従い大腸菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ に導入して、形質転換体:大腸菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ /pCRII-H7TMB56を得た。

実施例2 ヒト海馬由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定(2)

ヒト海馬cDNA(Marathon-Ready<sup>TM</sup> cDNA, CLONTECH社)を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1(配列番号:4)およびプライマー2(配列番号:5)を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記cDNAの10分の1量を鋳型として使用し、Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマー1(配列番号:4)およびプライマー2(配列番号:5)を各0.2 $\mu$ M、dNTPs 200 $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを加え、25 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、① 95℃・1分の後、② 94℃・20秒、72℃・2分のサイクルを3回、③ 94℃・20秒、68℃・2分のサイクルを3回、④ 94℃・20秒、63.5℃・20秒、68℃・2分20秒のサイクルを38回繰り返し、⑤ 最後に68℃・7分の伸長反応を行

った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpCRII(Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、cDNAをもつクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA配列(配列番号:7)を得た。このcDNAより導き出されるアミノ酸配列(配列番号:6)を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をH7TMB56Cと命名した。

10 実施例3 ヒトゲノム由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのクローニングと塩基配列の決定

ヒトゲノムDNA(約1ng/ $\mu$ l)を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1(配列番号:4)およびプライマー2(配列番号:5)を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は上記ゲノムDNAを鋳型として反応液の25分の1量使用し、Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH社)1/50量、プライマー1(配列番号:4)およびプライマー2(配列番号:5)を各0.2 $\mu$ M、dNTPs 200 $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを加え、25 $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、①94 $^{\circ}$ C・1分の後、②94 $^{\circ}$ C・20秒、72 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを4回、③94 $^{\circ}$ C・20秒、70 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを4回、④94 $^{\circ}$ C・20秒、68 $^{\circ}$ C・2分のサイクルを27回繰り返し、⑤最後に68 $^{\circ}$ C・7分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物をTAクローニングキット(Invitrogen社)の処方に従いプラスミドベクターpCRII(Invitrogen社)へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、ゲノム断片を持つクローンをアンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した後、個々のクローンの配列を解析した結果、実施例1および実施例2で得られた新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA配列(配列番号:2、配列番号:3および配列番号:7)と同一の塩基配列であることが確認された。



## 実施例 4 H 7 T M B 5 6 および H 7 T M B 5 6 C 発現 CHO 細胞の作製

実施例 1 と同様にして、H 7 T M B 5 6 C をコードする c D N A (配列番号 : 7) がサブクローニングされたプラスミド p C R I I - H 7 T M B 5 6 を、自体公知の方法に従い大腸菌 (*Escherichia coli*) D H 5  $\alpha$  に導入して、形質転換体 : 大腸菌 (*Escherichia coli*) D H 5  $\alpha$  / p C R I I - H 7 T M B 5 6 C を得た。

実施例 1 で作製した形質転換体 *E. coli* D H 5  $\alpha$  / p C R I I - H 7 T M B 5 6 もしくは、*E. coli* D H 5  $\alpha$  / p C R I I - H 7 T M B 5 6 C を培養後、プラスミド・ミドキット (キアゲン社) を用いて p C R I I - H 7 T M B 5 6 もしくは p C R I I - H 7 T M B 5 6 C のプラスミド DNA を調製した。これらのプラスミドから本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質 H 7 T M B 5 6 もしくは H 7 T M B 5 6 C をコードする c D N A をタンパク発現用プラスミドベクター p c D N A 3. 1 / V 5 / H i s へクローニングしてタンパク発現用プラスミド p c D N A 3. 1 - H 7 T M B 5 6 もしくは H 7 T M B 5 6 C を構築した。このようにして得たプラスミドは、プラスミド・ミドキット (キアゲン社) を用いて大量にプラスミド DNA を調製した後、セルフェクト・トランスフェクションキット (アマシャムファルマシアバイオテク社) を用い添付のプロトコールに従って CHO d h f r <sup>-</sup> 細胞に導入した。すなわち、10mg の DNA をリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24 時間前に  $5 \times 10^5$  または  $1 \times 10^6$  個の CHO d h f r <sup>-</sup> 細胞を播種した 10 cm シャーレに添加した後、10% ウシ胎児血清を含む MEM  $\alpha$  培地で 1 日間培養し、継代した後、選択培地である 0.4mg/ml の G 418 (ギブコ BRL 社) および 10% 透析ウシ胎児血清を含む MEM  $\alpha$  培地で培養した。選択培地中で増殖してくる形質転換細胞 (CHO/H 7 T M B 5 6 もしくは CHO/H 7 T M B 5 6 C) のコロニーを選択することにより、H 7 T M B 5 6 もしくは H 7 T M B 5 6 C 発現 CHO 細胞とした。

25 選択した H 7 T M B 5 6 発現 CHO 細胞から常法に従い全 RNA を抽出した後、TaqMan 法により H 7 T M B 5 6 の mRNA 量を測定・コピー数を算出した。結果を下表に示す。

表 1

クローンNo.	発現量 (コピー/ng 全RNA)	
	1 回目測定	2 回目測定
7	83046	89931
	104954	71409
9	32632	30669
	61153	28487
15	5146	7970
	7172	4882

## 産業上の利用可能性

- 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、その部分ペプチド
- 5 またはその塩、および該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNAおよびそれらの誘導体）は、①リガンド（アゴニスト）の決定、②抗体および抗血清の入手、③組み替え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデザインの実施、
- 10 ⑥遺伝子診断におけるプローブやPCRプライマーの作成のための試薬、⑦トランスジェニック動物の作製または⑧遺伝子予防・治療剤等の医薬等として用いることができる。

## 請求の範囲

1. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。  
5
2. 配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：6で表されるアミノ酸配列である請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩。
3. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。  
10
4. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。
5. DNAである請求項4記載のポリヌクレオチド。
6. 配列番号：2または配列番号：3で表される塩基配列を有する請求項4記載のポリヌクレオチド。  
15
7. 配列番号：6で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドを含有する請求項4記載のポリヌクレオチド。
8. DNAである請求項7記載のポリヌクレオチド。
9. 配列番号：7で表される塩基配列を有する請求項7記載のポリヌクレオチド。  
20
10. 請求項4記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
11. 請求項10記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。
12. 請求項11記載の形質転換体を培養し、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩の製造法。  
25
13. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
14. 請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のシグナル伝達を不活

性化する中和抗体である請求項 1 3 記載の抗体。

1 5. 請求項 1 3 記載の抗体を含有してなる診断薬。

1 6. 請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項 3 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることにより得られうる請求項 1 記載の G

5 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンド。

1 7. 請求項 1 6 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを含有してなる医薬。

1 8. 請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項 3 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする請求項 1 記載の G 蛋白

10 質共役型レセプター蛋白質またはその塩に対するリガンドの決定方法。

1 9. 請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項 3 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。

15 2 0. 請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは請求項 3 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とするリガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

2 1. 請求項 1 9 記載のスクリーニング方法または請求項 2 0 記載のスクリー  
20 ニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

2 2. 請求項 1 9 記載のスクリーニング方法または請求項 2 0 記載のスクリー  
ニング用キットを用いて得られうる、リガンドと請求項 1 記載の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩  
25 を含有してなる医薬。

2 3. 請求項 4 記載のポリヌクレオチドとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

2 4. 請求項 4 記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列またはその一部を含有してなるポリヌクレオチド。

25. 請求項4記載のポリヌクレオチドまたはその一部を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質のmRNAの定量方法。
26. 請求項13記載の抗体を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の定量方法。
- 5 27. 請求項25または請求項26記載の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の機能が関連する疾患の診断方法。
28. 請求項25記載の定量方法を用いることを特徴とする、請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩の
- 10 スクリーニング方法。
29. 請求項26記載の定量方法を用いることを特徴とする、細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
30. 請求項28記載のスクリーニング方法を用いて得られうる請求項1記載
- 15 のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現量を変化させる化合物またはその塩。
31. 請求項29記載のスクリーニング方法を用いて得られうる、細胞膜における請求項1記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質量を変化させる化合物またはその塩。

1/4

☒ 1

Parameter : Kyte & Doolittle  
Range to Average : 15

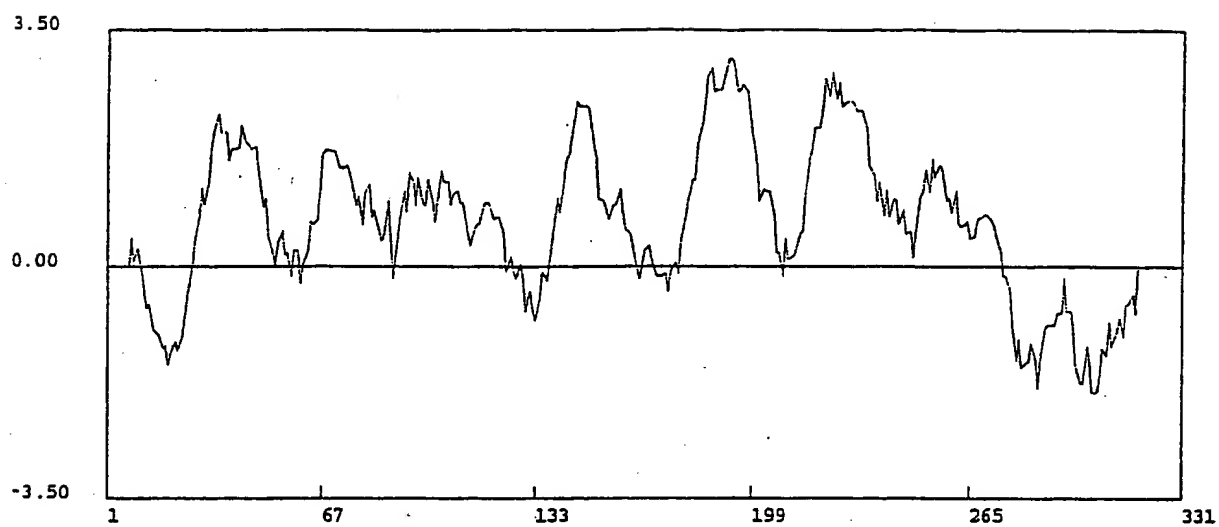


图 2

```

37 ISLVGLTGNVVLWLLGYRMRRNAVSIYILNLAAD.. FLFLSFQIIRSP 84  

   ||::|::|::|||:||||:|:|:|:|:|:|:|:  

41 ISPLGFVENGIILLWFLCFMRMRNPFTVYITHLSIADISLLFCIF. ILSID 89  

85 LRL... INISHLRKILVSVM.TFPYFTGLSMLSAISTERCLSVLWPIWY 130  

   |:::|:::|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|  

90 YALDYELSSGHYYTIVTL SVTF LF GYNTGLYL LT AISVERCLSVLYPIWY 139  

131 RCRRPHTLSAVVCVLLWGLSLLFSMLEWRFCDFLFSGADSSWCETSD... 177  

   ||::|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:  

140 RCHRPKHQSFAFVCALLWALSCLVTMEYVMC.. IDSGEESH.. SQSDCRA 185  

178 ... FIPVAWLIFLCVVLCVSSLVLLVRILCGSRKMPLTRLYVTILLTVLV 224  

   ||:::|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:  

186 VIIFIAILSFLVFTPLMLVSSTILVVKIRKNTWASHSSKLYIVIMVTIII 235  

225 FLICGLPFGILGALIY..... RMHLNLEVLYCHVYLCMSLSSLNSSA 267  

   ||:::|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:  

236 FLIFAMP RVLYLLYEYWSTFGNLH. NISLLF..... STINSSA 274  

268 NPIIYFFVG SFRQRQNRQNLKLVLQRALQDKPEVDKGEGQLPEESLE 314  

   ||:|||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:  

275 NPFIYFFVGSSKKKRFRSLKVVLTRA FKDEM QPRRQE GNNTV SIE 321

```

3/4

☒ 3

1 ATGGATCCAACCGTCCCAGTCTTGGGTACAAAACCTGACACCAATCAACGGACGTGAGGAG 60  
MetAspProThrValProValLeuGlyThrLysLeuThrProIleAsnGlyArgGluGlu

61 ACTCCTTGCTACAAGCAGACCCTGAGCTTCACGGTGCTGACGTGCATCATTTCCCTTGTC 120  
ThrProCysTyrLysGlnThrLeuSerPheThrValLeuThrCysIleIleSerLeuVal

121 GGA CTGACAGGAAACGCGGTTGTGCTCTGGCTCCTGGGCTGCCGCATGCCGAGGAACGCT 180  
GlyLeuThrGlyAsnAlaValValLeuTrpLeuLeuGlyCysArgMetArgArgAsnAla

181 GTCTCCATCTACATCCTCAACCTGGCCGAGCAGACTTCCTCTTCCTCAGCTTCCAGATT 240  
ValSerIleTyrIleLeuAsnLeuAlaAlaAlaAspPheLeuPheLeuSerPheGlnIle

241 ATACGTTGCCATTACGCCTCATCAATATCAGCCATCTCATCCGCAAAATCCTCGTTTCT 300  
IleArgSerProLeuArgLeuIleAsnIleSerHisLeuIleArgLysIleLeuValSer

301 GTGATGACCTTTCCCTACTTTACAGGCCTGAGTATGCTGAGCGCCATCAGCACCGAGCGC 360  
ValMetThrPheProTyrPheThrGlyLeuSerMetLeuSerAlaIleSerThrGluArg

361 TGCCTGTCTGTTCTGTGGCCCATCTGGTACCGCTGCCGCCGCCACACACCTGTCAGCG 420  
CysLeuSerValLeuTrpProIleTrpTyrArgCysArgArgProThrHisLeuSerAla

421 GTCGTGTGTGCTCCTGCTCTGGGGCCTGTCCCTGCTGTTTAGTATGCTGGAGTGGAGGTTC 480  
ValValCysValLeuLeuTrpGlyLeuSerLeuLeuPheSerMetLeuGluTrpArgPhe



4/4

☒ 4

481 TGTGACTTCCTGTTTAGTGGTGCTGATTCTAGTTGGTGTGAAACGTCAGATTTTCATCCCA 540  
CysAspPheLeuPheSerGlyAlaAspSerSerTrpCysGluThrSerAspPheIlePro

541 GTCGCGTGGCTGATTTTTTATGTGTGGTTCTCTGTGTTCCAGCCTGGTCCTGCTGGTC 600  
ValAlaTrpLeuIlePheLeuCysValValLeuCysValSerSerLeuValLeuLeuVal

601 AGGATCCTCTGTGGATCCCGGAAGATGCCGCTGACCAGGCTGTACGTGACCATCCTGCTC 660  
ArgIleLeuCysGlySerArgLysMetProLeuThrArgLeuTyrValThrIleLeuLeu

661 ACAGTGCTGGTCTTCCTCCTCTGCGGCCTGCCCTTCGGCATTCTGGGGGCCCTAATTTAC 720  
ThrValLeuValPheLeuLeuCysGlyLeuProPheGlyIleLeuGlyAlaLeuIleTyr

721 AGGATGCACCTGAATTTGGAAGTCTTATATTGTCATGTTTATCTGGTTTGCATGTCCCTG 780  
ArgMetHisLeuAsnLeuGluValLeuTyrCysHisValTyrLeuValCysMetSerLeu

781 TCCTCTCTAAACAGTAGTGCCAACCCCATCATTTACTTCTTCGTGGGCTCCTTTAGGCAG 840  
SerSerLeuAsnSerSerAlaAsnProIleIleTyrPhePheValGlySerPheArgGln

841 CGTCAAAATAGGCAGAACCTGAAGCTGGTTCTCCAGAGGGCTCTGCAGGACAAGCCTGAG 900  
ArgGlnAsnArgGlnAsnLeuLysLeuValLeuGlnArgAlaLeuGlnAspLysProGlu

901 GTGGATAAAGGTGAAGGGCAGCTTCCTGAGGAAAGCCTGGAGCTGTGGGAAGCAGATTG 960  
ValAspLysGlyGluGlyGlnLeuProGluGluSerLeuGluLeuSerGlySerArgLeu

961 GGGCCATGA 969  
GlyPro\*\*\*

## SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel G-Protein Coupled Receptor Protein and its DNA

<130> A98151

<150> JP 10-279512

<151> 1998-10-01

<130> A98209

<150> JP 10-298667

<151> 1998-10-20

<160> 7

<210> 1

<211> 322

<212> PRT

<213> Human

<400> 1

Met Asp Pro Thr Val Pro Val Phe Gly Thr Lys Leu Thr Pro Ile Asn

1 5 10 15

Gly Arg Glu Glu Thr Pro Cys Tyr Asn Gln Thr Leu Ser Phe Thr Val

20 25 30

Leu Thr Cys Ile Ile Ser Leu Val Gly Leu Thr Gly Asn Ala Val Val

35 40 45

Leu Trp Leu Leu Gly Tyr Arg Met Arg Arg Asn Ala Val Ser Ile Tyr

50 55 60

Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Phe Gln Ile

65 70 75 80

Ile Arg Ser Pro Leu Arg Leu Ile Asn Ile Ser His Leu Ile Arg Lys

85 90 95

Ile Leu Val Ser Val Met Thr Phe Pro Tyr Phe Thr Gly Leu Ser Met

100 105 110

Leu Ser Ala Ile Ser Thr Glu Arg Cys Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile

115 120 125

2/6

Trp Tyr Arg Cys Arg Arg Pro Thr His Leu Ser Ala Val Val Cys Val  
 130 135 140  
 Leu Leu Trp Gly Leu Ser Leu Leu Phe Ser Met Leu Glu Trp Arg Phe  
 145 150 155 160  
 Cys Asp Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asp Ser Ser Trp Cys Glu Thr Ser  
 165 170 175  
 Asp Phe Ile Pro Val Ala Trp Leu Ile Phe Leu Cys Val Val Leu Cys  
 180 185 190  
 Val Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys  
 195 200 205  
 Met Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val  
 210 215 220  
 Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Leu Gly Ala Leu Ile Tyr  
 225 230 235 240  
 Arg Met His Leu Asn Leu Glu Val Leu Tyr Cys His Val Tyr Leu Val  
 245 250 255  
 Cys Met Ser Leu Ser Ser Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr  
 260 265 270  
 Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys  
 275 280 285  
 Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Lys Pro Glu Val Asp Lys Gly  
 290 295 300  
 Glu Gly Gln Leu Pro Glu Glu Ser Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu  
 305 310 315 320  
 Gly Pro  
 322  
 <210> 2  
 <211> 969  
 <212> DNA.  
 <213> Human  
 <400> 2

3/6

```

ATGGATCCAA CCGTCCCAGT CTTCGGTACA AACTGACAC CAATCAACGG ACGTGAGGAG 60
ACTCCTTGCT ACAATCAGAC CCTGAGCTTC ACGGTGCTGA CGTGCATCAT TTCCCTTGTC 120
GGA CTGACAG GAAACGCGGT AGTGCTCTGG CTCCTGGGCT ACCGCATGCG CAGGAACGCT 180
GTCTCCATCT ACATCCTCAA CCTGGCCGCA GCAGACTTCC TCTTCCTCAG CTTCCAGATT 240
ATACGTTTCG CATTACGCCT CATCAATATC AGCCATCTCA TCCGCAAAT CCTCGTTTCT 300
GTGATGACCT TTCCCTACTT TACAGGCCTG AGTATGCTGA GCGCCATCAG CACCGAGCGC 360
TGCCTGTCTG TTCTGTGGCC CATCTGGTAC CGCTGCCGCC GCCCCACACA CCTGTCAGCG 420
GTCGTGTGTG TCCTGCTCTG GGGCCTGTCC CTGCTGTTTA GTATGCTGGA GTGGAGGTTT 480
TGTGACTTCC TGTTTAGTGG TGCTGATTCT AGTTGGTGTG AAACGTCAGA TTTCATCCCA 540
GTCGCGTGGC TGATTTTTTT ATGTGTGGTT CTCTGTGTTT CCAGCCTGGT CCTGCTGGTC 600
AGGATCCTCT GTGGATCCCG GAAGATGCCG CTGACCAGGC TGTACGTGAC CATCCTGCTC 660
ACAGTGCTGG TCTTCCTCCT CTGCGGCCTG CCCTTCGGCA TTCTGGGGGC CCTAATTTAC 720
AGGATGCACC TGAATTTGGA AGTCTTATAT TGTCATGTTT ATCTGGTTTG CATGTCCCTG 780
TCCTCTCTAA ACAGTAGTGC CAACCCCATC ATTTACTTCT TCGTGGGCTC CTTTAGGCAG 840
CGTCAAATA GGCAGAACCT GAAGCTGGTT CTCCAGAGGG CTCTGCAGGA CAAGCCTGAG 900
GTGGATAAAG GTGAAGGGCA GCTTCCTGAG GAAAGCCTGG AGCTGTCGGG AAGCAGATTG 960
GGGCCATGA 969

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 969

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 3

```

ATGGATCCAA CCGTCCCAGT CTTCGGTACA AACTGACAC CAATCAACGG ACGTGAGGAG 60
ACTCCTTGCT ACAATCAGAC CCTGAGCTTC ACGGTGCTGA CGTGCATCAT TTCCCTTGTC 120
GGA CTGACAG GAAACGCGGT TGTGCTCTGG CTCCTGGGCT ACCGCATGCG CAGGAACGCT 180
GTCTCCATCT ACATCCTCAA CCTGGCCGCA GCAGACTTCC TCTTCCTCAG CTTCCAGATT 240
ATACGTTTCG CATTACGCCT CATCAATATC AGCCATCTCA TCCGCAAAT CCTCGTTTCT 300
GTGATGACCT TTCCCTACTT TACAGGCCTG AGTATGCTGA GCGCCATCAG CACCGAGCGC 360
TGCCTGTCTG TTCTGTGGCC CATCTGGTAC CGCTGCCGCC GCCCCACACA CCTGTCAGCG 420
GTCGTGTGTG TCCTGCTCTG GGGCCTGTCC CTGCTGTTTA GTATGCTGGA GTGGAGGTTT 480
TGTGACTTCC TGTTTAGTGG TGCTGATTCT AGTTGGTGTG AAACGTCAGA TTTCATCCCA 540

```

4/6

GTCGCGTGGC TGATTTTTTT ATGTGTGGTT CTCTGTGTTT CCAGCCTGGT CCTGCTGGTC 600  
 AGGATCCTCT GTGGATCCCG GAAGATGCCG CTGACCAGGC TGTACGTGAC CATCCTGCTC 660  
 ACAGTGCTGG TCTTCCTCCT CTGCGGCCTG CCCTTCGGCA TTCTGGGGGC CCTAATTTAC 720  
 AGGATGCACC TGAATTTGGA AGTCTTATAT TGTCATGTTT ATCTGGTTTG CATGTCCCTG 780  
 TCCTCTCTAA ACAGTAGTGC CAACCCCATC ATTTACTTCT TCGTGGGCTC CTTTAGGCAG 840  
 CGTCAAAATA GGCAGAACCT GAAGCTGGTT CTCCAGAGGG CTCTGCAGGA CAAGCCTGAG 900  
 GTGGATAAAG GTGAAGGGCA GCTTCCTGAG GAAAGCCTGG AGCTGTCGGG AAGCAGATTG 960  
 GGGCCATGA 969

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 4

GTCGACATGG ATCCAACCGT CCCAGTCTT 29

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

ACTAGTTCAT GGCCCCAATC TGCTTCC 27

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 322

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 6

Met Asp Pro Thr Val Pro Val Leu Gly Thr Lys Leu Thr Pro Ile Asn

1

5

10

15

5/6

Gly Arg Glu Glu Thr Pro Cys Tyr Lys Gln Thr Leu Ser Phe Thr Val  
                   20                                  25                                  30  
 Leu Thr Cys Ile Ile Ser Leu Val Gly Leu Thr Gly Asn Ala Val Val  
                   35                                  40                                  45  
 Leu Trp Leu Leu Gly Cys Arg Met Arg Arg Asn Ala Val Ser Ile Tyr  
                   50                                  55                                  60  
 Ile Leu Asn Leu Ala Ala Ala Asp Phe Leu Phe Leu Ser Phe Gln Ile  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Ile Arg Ser Pro Leu Arg Leu Ile Asn Ile Ser His Leu Ile Arg Lys  
                   85                                  90                                  95  
 Ile Leu Val Ser Val Met Thr Phe Pro Tyr Phe Thr Gly Leu Ser Met  
                   100                                  105                                  110  
 Leu Ser Ala Ile Ser Thr Glu Arg Cys Leu Ser Val Leu Trp Pro Ile  
                   115                                  120                                  125  
 Trp Tyr Arg Cys Arg Arg Pro Thr His Leu Ser Ala Val Val Cys Val  
                   130                                  135                                  140  
 Leu Leu Trp Gly Leu Ser Leu Leu Phe Ser Met Leu Glu Trp Arg Phe  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Cys Asp Phe Leu Phe Ser Gly Ala Asp Ser Ser Trp Cys Glu Thr Ser  
                   165                                  170                                  175  
 Asp Phe Ile Pro Val Ala Trp Leu Ile Phe Leu Cys Val Val Leu Cys  
                   180                                  185                                  190  
 Val Ser Ser Leu Val Leu Leu Val Arg Ile Leu Cys Gly Ser Arg Lys  
                   195                                  200                                  205  
 Met Pro Leu Thr Arg Leu Tyr Val Thr Ile Leu Leu Thr Val Leu Val  
                   210                                  215                                  220  
 Phe Leu Leu Cys Gly Leu Pro Phe Gly Ile Leu Gly Ala Leu Ile Tyr  
 225                                  230                                  235                                  240  
 Arg Met His Leu Asn Leu Glu Val Leu Tyr Cys His Val Tyr Leu Val  
                   245                                  250                                  255  
 Cys Met Ser Leu Ser Ser Leu Asn Ser Ser Ala Asn Pro Ile Ile Tyr

6/6

260 265 270  
 Phe Phe Val Gly Ser Phe Arg Gln Arg Gln Asn Arg Gln Asn Leu Lys  
 275 280 285  
 Leu Val Leu Gln Arg Ala Leu Gln Asp Lys Pro Glu Val Asp Lys Gly  
 290 295 300  
 Glu Gly Gln Leu Pro Glu Glu Ser Leu Glu Leu Ser Gly Ser Arg Leu  
 305 310 315 320  
 Gly Pro  
 322

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 969

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 7

ATGGATCCAA CCGTCCCAGT CTTGGGTACA AACTGACAC CAATCAACGG ACGTGAGGAG 60  
 ACTCCTTGCT ACAAGCAGAC CCTGAGCTTC ACGGTGCTGA CGTGTCATCAT TTCCCTTGTC 120  
 GGA CTGACAG GAAACGCGGT AGTGCTCTGG CTCCTGGGCT GCCGCATGCG CAGGAACGCT 180  
 GTCTCCATCT ACATCCTCAA CCTGGCCGCA GCAGACTTCC TCTTCCTCAG CTTCCAGATT 240  
 ATACGTTTCG CATTACGCCT CATCAATATC AGCCATCTCA TCCGCAAAT CCTCGTTTCT 300  
 GTGATGACCT TTCCCTACTT TACAGGCCTG AGTATGCTGA GCGCCATCAG CACCGAGCGC 360  
 TGCCTGTCTG TTCTGTGGCC CATCTGGTAC CGCTGCCGCC GCCCCACACA CCTGTGACGG 420  
 GTCGTGTGTG TCCTGCTCTG GGGCCTGTCC CTGCTGTTTA GTATGCTGGA GTGGAGGTTC 480  
 TGTGACTTCC TGTTTAGTGG TGCTGATTCT AGTTGGTGTG AAACGTCAGA TTTCATCCCA 540  
 GTCGCGTGGC TGATTTTTTT ATGTGTGGTT CTCTGTGTTT CCAGCCTGGT CCTGCTGGTC 600  
 AGGATCCTCT GTGGATCCCG GAAGATGCCG CTGACCAGGC TGTACGTGAC CATCCTGCTC 660  
 ACAGTGCTGG TCTTCCTCCT CTGCGGCCTG CCCTTCGGCA TTCTGGGGGC CCTAATTTAC 720  
 AGGATGCACC TGAATTGGA AGTCTTATAT TGTCATGTTT ATCTGGTTTG CATGTCCCTG 780  
 TCCTCTCTAA ACAGTAGTGC CAACCCCATC ATTTACTTCT TCGTGGGCTC CTTTAGGCAG 840  
 CGTCAAATA GGCAGAACCT GAAGCTGGTT CTCCAGAGGG CTCTGCAGGA CAAGCCTGAG 900  
 GTGGATAAAG GTGAAGGGCA GCTTCCTGAG GAAAGCCTGG AGCTGTCGGG AAGCAGATTG 960  
 GGGCCATGA 969

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05365

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/705, 16/28, C12N1/21, 15/12, C12P21/02,  
G01N33/68, A61K38/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K14/00-14/825, C12N15/11-15/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Cell, Vol. 45, No. 5, issued 06 June, 1986, Dallan Young et al., "Isolation and Characterization of a New Cellular Oncogene Encoding a Protein with Multiple Potential Transmembrane Domains", pages 711-719	24 1-23, 25, 26, 28-31
X A	Molecular Endocrinology, Vol. 6, No. 12, issued December, 1992, Yuichiro Yamada et al., 'Somatostatin Receptors, an Expanding Gene Family: Cloning and Functional Characterization of Human SSTR3, a Protein Coupled to Adenylyl Cyclase", pages 2136-2142	24 1-23, 25, 26, 28-31
X A	FEBS Letters, Vol. 321, Nos. 2,3, issued 26 April, 1993, Jacquie D. Corness et al., "A human somatostatin receptor (SSTR3), located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptides", pages 279-284	24 1-23, 25, 26, 28-31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
11 January, 2000 (11.01.00)

Date of mailing of the international search report  
25 January, 2000 (25.01.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05365

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 89, No. 1, issued 01 January, 1992, Yuichiro Yamada et al., "Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney", pages 251-255	24 1-23, 25, 26, 28-31
A	Molecular Endocrinology, Vol. 5, No. 10, issued October, 1991, C. Monnot et al., "Cloning and Functional Characterization of a Novel mas-Related Gene, Modulating Intracellular Angiotensin II Actions", pages 1477-1487	1-26, 28-31
A	Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 85, No. 14, issued July 1988, Dallan Young et al., "Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain", pages 5339-5342	1-26, 28-31
A	WO, 96/16087, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 30 May, 1996 (30.05.96) & AU, 9515501, A & ZA, 9409667, A & EP, 871667, A1 & JP, 10-509870, A	1-26, 28-31

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05365

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claim 27 relates to a method for diagnosis of the human body.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/705, 16/28, C12N1/21, 15/12, C12P21/02,  
G01N33/68, A61K38/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K14/00-14/825, C12N15/11-15/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,  
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Cell, Volume 45, Number 5, issued 6 June 1986, Dallan Young et al., "Isolation and Characterization of a New Cellular Oncogene Encoding a Protein with Multiple Potential Transmembrane Domains", pages 711-719	24
A		1-23, 25, 26, 28-31
X	Molecular Endocrinology, Volume 6, Number 12, issued December 1992, Yuichiro Yamada et al., "Somatostatin Receptors, an Expanding Gene Family: Cloning and Functional Characterization of Human SSTR3, a Protein Coupled to Adenylyl Cyclase" pages 2136-2142	24
A		1-23, 25, 26, 28-31

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.01.00

国際調査報告の発送日

25.01.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	FEBS Letters, Volume 321, Number 2,3, issued 26 April 1993, Jacquie D. Corness et al., "A human somatostatin receptor (SSTR3), located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptides", pages 279-284	24 1-23, 25, 26, 28-31
X A	Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Volume 89, Number 1, issued 1 January 1992, Yuichiro Yamada et al., "Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney", pages 251-255	24 1-23, 25, 26, 28-31
A	Molecular Endocrinology, Volume 5, Number 10, issued October 1991, C. Monnot et al., "Cloning and Functional Characterization of a Novel mas-Related Gene, Modulating Intracellular Angiotensin II Actions", pages 1477-1487	1-26, 28-31
A	Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Volume 85, Number 14, issued July 1988, Dallan Young et al., "Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain", pages 5339-5342	1-26, 28-31
A	WO, 96/16087, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 30.5月.1996 (30.05.96) & AU, 9515501, A & ZA, 9409667, A & EP, 871667, A1 & JP, 10-509870, A	1-26, 28-31

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見(第1ページの2の続き)

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 27 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、  
請求の範囲 27 の発明は、人の身体の診断方法に該当する。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

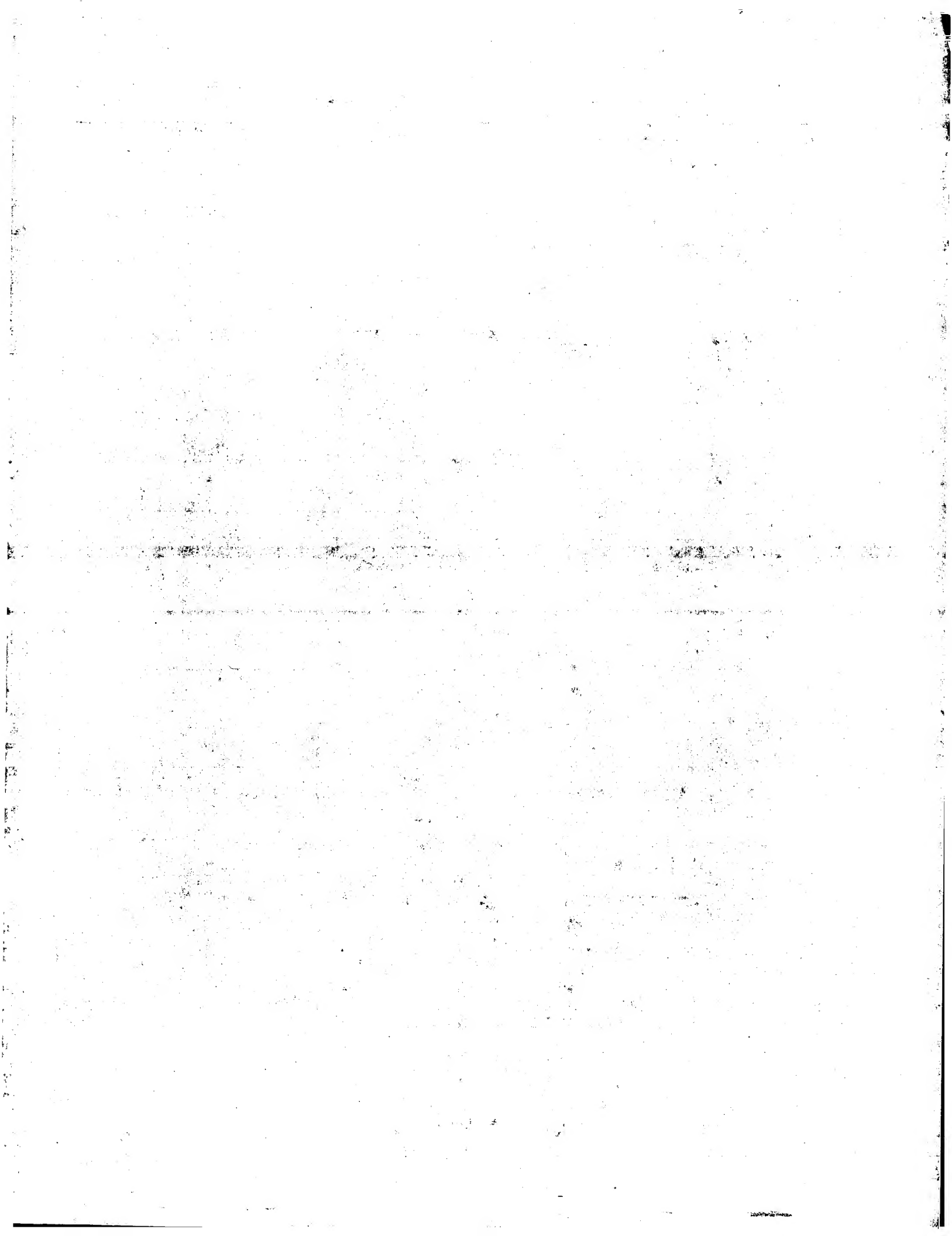
**第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1 ページの3の続き)**

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

**EP 1 118 621 A1**

(12)

**EUROPEAN PATENT APPLICATION**

published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:

25.07.2001 Bulletin 2001/30

(21) Application number: 99969941.6

(22) Date of filing: 30.09.1999

(51) Int Cl.7: **C07K 14/705**, C07K 16/28,  
C12N 1/21, C12N 15/12,  
C12P 21/02, G01N 33/68,  
A61K 38/00

(86) International application number:  
**PCT/JP99/05365**

(87) International publication number:  
**WO 00/20456 (13.04.2000 Gazette 2000/15)**

(84) Designated Contracting States:

**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU  
MC NL PT SE**

Designated Extension States:

**AL LT LV MK RO SI**

(30) Priority: 01.10.1998 JP 27951298

20.10.1998 JP 29866798

(71) Applicant: **Takeda Chemical Industries, Ltd.**

**Osaka-shi, Osaka 541-0045 (JP)**

(72) Inventors:

- **WATANABE, Takuya**  
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0821 (JP)
- **TERAO, Yasuko**  
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0034 (JP)
- **FUKUSUMI, Shoji**  
Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0044 (JP)

(74) Representative: **Keller, Günter, Dr. et al**

**Lederer, Keller & Riederer**  
**Patentanwälte**  
**Prinzregentenstrasse 16**  
**80538 München (DE)**

(54) **NOVEL G PROTEIN-COUPLED RECEPTOR PROTEIN AND DNA THEREOF**

(57) The present invention relates to a human-derived G-protein coupled receptor protein or a partial peptide thereof or a salt thereof, a nucleic acid encoding said receptor protein and a derivative thereof.

A G-protein coupled receptor protein derived from a human hippocampus according to the invention or a nucleic acid encoding said protein and a derivative

thereof can be used in determining a ligand (agonist) for a G-protein coupled receptor protein of the invention, in a preventing and/or treating agent against a disease related to a dysfunction of a G-protein coupled receptor protein of the invention, in a gene diagnostic agent, and in screening for a compound capable of altering the expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof.

**EP 1 118 621 A1**

**Description**Technical Field

- 5 **[0001]** The present invention relates to a novel human G-protein coupled receptor protein or a salt thereof and a DNA encoding the same.

Background of the Invention

- 10 **[0002]** Many bioactive substances such as hormones and neurotransmitters serve to regulate the biological functions via specific receptor proteins which are present in cell membranes. Since most of such receptor proteins effect an intracellular signal transmission via the activation of a guanine nucleotide-binding protein (hereinafter sometimes referred to as G protein) coupling therewith and have a common structure containing 7 transmembrane regions, they are referred to together as G-protein coupled receptor proteins or 7 transmembrane receptor proteins (7TMR).

- 15 **[0003]** A G-protein coupled receptor protein is present on each functional cell surface in an in vivo cell or organ, and plays a physiologically important role as a target of a molecule which regulates the function of such cell or organ, including hormones, neurotransmitters and bioactive substances. A receptor transmits a signal to the inside of a cell via the binding to a bioactive substance, and such signal induces various reactions such as the activation or inhibition of the cell.

- 20 **[0004]** To clarify the relationship between a substance which regulates a complicated function in every in vivo cell or organ and a receptor protein specific thereto, especially a G-protein coupled receptor protein, serves to provide a valuable means for understanding the function in a cell or an organ of various organisms and for developing a pharmaceutical related closely to such function.

- 25 **[0005]** For example, the physiological function of every in vivo organ is regulated under the control of a diversity of hormones, hormone-like substances, neurotransmitters and bioactive substances. Especially, bioactive substances are present in various in vivo locations, and regulate the physiological functions in such locations via the relevant receptor proteins. Many in vivo hormones, neurotransmitters and other bioactive substances still remain uncharacterized, and their receptor protein structures have scarcely been reported. Moreover, even as to known receptor proteins, it has been poorly clarified whether its subtype exists or not.

- 30 **[0006]** To characterize the relationship between a substance regulating a complicated in vivo function and a receptor protein specific thereto is a very important means in developing a pharmaceutical. In addition, for the purpose of screening efficiently for an agonist and an antagonist for the receptor protein described above and to develop a pharmaceutical, it is essential to understand the function of a gene encoding a receptor protein expressed in vivo and to express the same in a suitable expression system.

- 35 **[0007]** Recently, studies on the random analysis of cDNA sequences as a means for analyzing a gene expressed in vivo are being extensively performed, and fragment sequences of such cDNA thus obtained is registered as an Expressed Sequence Tag (EST) in a data base, where it is disclosed. However, most of such ESTs contain only sequence data, from which the relevant function is not evident.

- 40 **[0008]** A substance having an inhibitory effect on the binding between a G-protein coupled receptor and a bioactive substance (i.e., ligand) or a substance effecting a signal transmission similarly to a bioactive substance (i.e., ligand) as a result of binding has been utilized as an antagonist or an agonist specific to such receptor in a pharmaceutical which regulates an in vivo function. Accordingly, to identify a novel G-protein coupled receptor protein which is not only important in an in vivo physiological expression but also can serve as a target in developing a pharmaceutical and to clone its gene (for example, cDNA) serves as a very important means for identifying a novel G-protein coupled receptor protein-specific ligand, agonist or antagonist.

- 45 **[0009]** Nevertheless, not all G-protein coupled receptors have been identified, and there are currently still many unknown G-protein coupled receptors and so-called orphan receptors whose relevant ligands are not identified, thus causing a demand for exploring a novel G-protein coupled receptor as well as for clarifying the function thereof.

- 50 **[0010]** A G-protein coupled receptor is useful in searching for a novel bioactive substance (i.e., ligand) and also in searching for an agonist or an antagonist for such receptor utilizing its signal transmitting effect as an index. On the other hand, an agonist or an antagonist for such receptor can be produced by analyzing the physiological effect of the receptor based on an inactivation experiment of the receptor (in a knockout animal), even if no physiological ligand can be identified. A ligand, an agonist or an antagonist for such receptor is expected to be utilized as a preventing and/or treating agent or a diagnostic agent for a disease related to the dysfunction of a G-protein coupled receptor.

- 55 **[0011]** In addition, a reduced or increased in vivo function of a G-protein coupled receptor resulting from a gene variation of such receptor frequently induces a certain disease. In such a case, gene therapy by introducing the receptor gene into a living body (or into a certain organ) or by introducing an antisense nucleic acid into the receptor gene is possible in addition to the administration of an antagonist or an agonist to the receptor. For this purpose, the base



sequence of the receptor is essential information for detecting a deletion or a variation in the gene, and a gene of the receptor is applicable to a preventing and/or treating agent or a diagnostic agent for a disease related to the dysfunction of the receptor.

## 5 Disclosure of the Invention

[0012] The present invention is intended to provide a novel human G-protein coupled receptor protein which is useful as discussed above. Thus, a novel human G-protein coupled receptor protein or a partial peptide or a salt thereof, a polynucleotide (DNA, RNA or a derivative thereof) comprising a polynucleotide (DNA, RNA or a derivative thereof) encoding such G-protein coupled receptor protein or a partial peptide thereof, a recombinant vector comprising such polynucleotide, a transformant containing such recombinant vector, a method for producing such G-protein coupled receptor protein or a salt thereof, an antibody against such G-protein coupled receptor protein or a partial peptide or a salt thereof, a compound which alters the expression level of such G-protein coupled receptor protein, a method for determining a ligand for such G-protein coupled receptor protein, a method for screening for a compound (antagonist, agonist) or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and such G-protein coupled receptor protein, a kit for such screening, a compound (antagonist, agonist) or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and such G-protein coupled receptor protein which can be obtained by using such screening method or screening kit, and, a pharmaceutical comprising a compound (antagonist, agonist) or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and such G-protein coupled receptor protein or a compound capable of altering the expression level of such G-protein coupled receptor protein are provided here.

[0013] We made an effort and then discovered that a cDNA encoding a novel G-protein coupled receptor protein derived from a human hippocampus can successfully be isolated and sequenced for its entire bases based on an EST database prepared by a degenerated PCR. Then we found the first to seventh transmembrane regions on a hydrophobic plot based on the translation from the base sequence described above into an amino acid sequence, and ensured that the proteins encoded by these cDNAs were the G-protein coupled receptor proteins of the 7 transmembrane region type. Based on these findings, we made a further effort and finally established the invention.

[0014] Thus, the present invention relates to:

- (1) a G-protein coupled receptor protein comprising an amino acid sequence identical or substantially identical to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1 or a salt thereof;
- (2) a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above wherein an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1 is the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.6 or a salt thereof;
- (3) a partial peptide of a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof;
- (4) a polynucleotide comprising a polynucleotide having a base sequence encoding a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above;
- (5) a polynucleotide according to Section (4) described above which is a DNA;
- (6) a polynucleotide according to Section (4) described above having the base sequence represented by SEQ ID NO.2 or SEQ ID NO.3;
- (7) a polynucleotide according to Section (4) described above comprising a polynucleotide having a base sequence encoding a G-protein coupled receptor protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.6;
- (8) a polynucleotide according to Section (7) described above which is a DNA;
- (9) a polynucleotide according to Section (7) described above having the base sequence represented by SEQ ID NO.7;
- (10) a recombinant vector comprising a polynucleotide according to Section (4) described above;
- (11) a transformant transformed with a recombinant vector according to Section (10) described above;
- (12) a method for producing a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof comprising incubating a transformant according to Section (11) described above to produce a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above;
- (13) an antibody directed to a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof;
- (14) an antibody according to Section (13) described above which is a neutralizing antibody which inactivates the signal transmission of a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above;
- (15) a diagnostic agent comprising an antibody according to Section (13) described above;
- (16) a ligand for a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof obtained by using a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof;

- (17) a pharmaceutical comprising a ligand for a G-protein coupled receptor protein according to Section (16) described above;
- (18) a method for determining a ligand for a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof comprising using a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof;
- (19) a method for screening for a compound or a salt thereof which is capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof comprising using a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof;
- (20) a kit for screening for a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof comprising using a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof;
- (21) a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof which can be obtained by using a screening method according to Section (19) described above or a screening kit according to Section (20) described above;
- (22) a pharmaceutical comprising a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof which can be obtained by using a screening method according to Section (19) described above or a screening kit according to Section (20) described above;
- (23) a polynucleotide capable of being hybridized with a polynucleotide according to Section (4) described above under a high stringent condition;
- (24) a polynucleotide comprising a base sequence or a part thereof which is complementary with a polynucleotide according to Section (4) described above;
- (25) a method for quantifying an mRNA of a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above comprising using a polynucleotide according to Section (4) described above or a part thereof;
- (26) a method for quantifying a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above comprising using an antibody according to Section (13) described above;
- (27) a method for diagnosing a disease related to a function of a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above comprising using a quantification method according to Section (25) described above or Section (26) described above;
- (28) a method for screening for a compound or a salt thereof capable of altering the expression level of a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above comprising using a quantification method according to Section (25) described above;
- (29) a method for screening for a compound or a salt thereof capable of altering the amount of a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above in a cell membrane comprising using a quantification method according to Section (26) described above;
- (30) a compound or a salt thereof capable of altering the expression level of a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above which can be obtained by using a screening method according to Section (28) described above; and,
- (31) a compound or a salt thereof capable of altering the amount of a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above in a cell membrane which can be obtained by using a screening method according to Section (29) described above.

[0015] Those also provided are:

- (32) a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof wherein said protein is a protein comprising [1] an amino acid sequence formed as a result of the deletion of one or more (preferably 1 to about 30, more preferably 1 to about 9, most preferably 1 to 5) amino acids in the amino acid sequence represented by Sequence ID. NO.1, [2] an amino acid sequence formed as a result of the addition of one or more (preferably 1 to about 30, more preferably 1 to about 10, most preferably 1 to 5) amino acids to the amino acid sequence represented by Sequence ID. NO.1, [3] an amino acid sequence formed as a result of the substitution of one or more (preferably 1 to about 30, more preferably 1 to about 10, most preferably 1 to 5) amino acids in the amino acid sequence represented by Sequence ID. NO.1 by other amino acids or [4] an amino acid as a combination thereof;
- (33) a method for determining a ligand according to Section (18) described above comprising bringing a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof or a partial peptide according

to Section (3) described above or a salt thereof into contact with a test substance;

(34) a method for determining a ligand according to Section (33) wherein said ligand is, for example, angiotensin, bombesin, cannabinoid, cholecystokinin, glutamin, serotonin, melatonin, neuropeptide Y, opioid, purine, vasopressin, oxytocin, PACAP, secretin, glucagon, calcitonin, adrenomedullin, somatostatin, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, VIP (vasoactive intestinal polypeptide), somatostatin, dopamine, motilin, amylin, bradykinin, CGRP (calcitonin gene-related peptide), leucotriene, pancreastatin, prostaglandine, thromboxane, adenosine, adrenaline,  $\alpha$  and  $\beta$ -chemokine (for example, IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, NIP1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES and the like), endoserine, enterogastrin, histamine, neurotensin, TRH, pancreatic polypeptide or galanin;

(35) a screening method according to Section (19) described above comprising a comparison between (i) a contact of a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof or a partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof with a ligand and (ii) a contact of the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or the salt thereof or the partial peptide according to Section (3) described above or the salt thereof with the ligand and a test compound;

(36) a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof comprising a determination of and a comparison between the levels of the binding of a labeled ligand to the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or the salt thereof or a partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof upon (i) a contact of the labeled ligand with the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or the salt thereof or the partial peptide according to Section (3) described above or the salt thereof and upon (ii) a contact of the labeled ligand and a test compound with the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or the salt thereof or the partial peptide according to Section (3) described above or the salt thereof;

(37) a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof comprising a determination of and a comparison between the levels of the binding of a labeled ligand to a cell comprising the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above upon (i) a contact of the labeled ligand with said cell and upon (ii) a contact of the labeled ligand and a test substance with said cell;

(38) a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof comprising a determination of and a comparison between the levels of the binding of a labeled ligand to a membrane fraction of a cell comprising a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above upon (i) a contact of the labeled ligand with the membrane fraction of said cell and upon (ii) a contact of the labeled ligand and a test substance with the membrane fraction of said cell;

(39) a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof expressed on the cell membrane of a transformant according to Section (11) described above by incubating said transformant comprising a determination of and a comparison between the levels of the binding of a labeled ligand to said G-protein coupled receptor protein upon (i) a contact of the labeled ligand with said G-protein coupled receptor protein and upon (ii) a contact of the labeled ligand and a test substance with said G-protein coupled receptor protein;

(40) a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof comprising a determination of and a comparison between the cell stimulating activities via the G-protein coupled receptor protein upon (i) a contact of a compound activating the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof with a cell comprising the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above and upon (ii) a contact of a compound activating the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof and a test compound with a cell comprising the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above;

(41) a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof comprising a determination of and a comparison between the cell stimulating activities via the G-protein coupled receptor protein upon a contact of a compound activating the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof with the G-protein coupled receptor protein expressed on the cell membrane of a transformant according to Section (11) described above by incubating said transformant and upon a contact of a compound activating the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof and a test compound with the G-protein coupled receptor protein expressed on the cell membrane of the transformant according to Section (11) described above by incubating said transformant;

(42) a screening method according to Section (40) or (41) described above wherein said compound activating the

G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above is angiotensin, bombesin, cannabinoid, cholecystokinin, glutamin, serotonin, melatonin, neuropeptide Y, opioid, purine, vasopressin, oxytocin, PACAP, secretin, glucagon, calcitonin; adrenomedullin, somatostatin, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, VIP (vasoactive intestinal polypeptide), somatostatin, dopamine, motilin, amylin, bradykinin, CGRP (calcitonin gene-related peptide), leucotriene, pancreastatin, prostaglandine, thromboxane, adenosine, adrenaline,  $\alpha$  and  $\beta$ -chemokine (for example, IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, NIP1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES and the like), endoserine, enterogastrin, histamine, neurotensin, TRH, pancreatic polypeptide or galanin; (43) a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof which can be obtained by a screening method according to Sections (35) to (42) described above;

(44) a pharmaceutical comprising a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof which can be obtained by a screening method according to Sections (35) to (42) described above;

(45) a screening kit according to Section (20) described above comprising a cell comprising a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above;

(46) a screening kit according to Section (20) described above comprising a membrane fraction of a cell comprising a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above;

(47) a screening kit according to Section (20) described above comprising a G-protein coupled receptor protein expressed on the cell membrane of a transformant according to Section (11) described above by incubating said transformant;

(48) a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof which can be obtained by using a screening kit according to Sections (45) to (47) described above;

(49) a pharmaceutical comprising a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a salt thereof which can be obtained by using a screening kit according to Sections (45) to (47) described above;

(50) a method for quantifying a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof comprising bringing an antibody according to Section (13) described above into contact with the G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or the partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof;

(51) a method for quantifying a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof in a sample solution comprising a competitive reaction of an antibody according to Section (13) described above with the sample solution and a labeled G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof followed by a determination of the ratio of the labeled G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof bound to said antibody; and,

(52) a method for quantifying a G-protein coupled receptor protein according to Section (1) described above or a partial peptide according to Section (3) described above or a salt thereof in a sample solution comprising a simultaneous or sequential reaction of a sample solution with an antibody according to Section (13) described above which is insolubilized on a support and a labeled antibody according to Section (13) described above followed by a determination of the activity of the label on the insolubilized support.

#### Brief Description of the Drawings

[0016] Figure 1 shows a hydrophobicity plot of a G-protein coupled receptor protein according to the invention made based on the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1.

[0017] Figure 2 shows the homology of a G-protein coupled receptor protein according to the invention having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1 when compared with the amino acid sequence of MAS. In this figure, the upper sequence corresponds to the G-protein coupled receptor protein according to the invention and the lower sequence is the amino acid sequence of MAS.

[0018] Figure 3 shows the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.6 and the base sequence represented by SEQ ID NO.7 (the upper sequence is the base sequence, and the lower sequence is the amino acid sequence) (continued to Figure 4).

[0019] Figure 4 shows the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.6 and the base sequence represented by SEQ ID NO.7 (the upper sequence is the base sequence, and the lower sequence is the amino acid sequence) (continued from Figure 3).

Best Mode for Carrying out the Invention

**[0020]** A G-protein coupled receptor protein according to the invention (hereinafter sometimes referred to as a receptor protein) is a receptor protein comprising an amino acid sequence identical or substantially identical to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1.

**[0021]** A receptor protein of the invention may be a protein derived for example from any of various cells (for example, splenic cell; neurocyte, gliocyte, pancreatic  $\beta$  cell, myelocyte, mesangial cell, Langerhans cell, epidermic cell, epithelial cell, endothelial cell, fibroblast, fibrocyte, myocyte, fat cell, immunocyte (e.g., macrophage, T cell, B cell, natural killer cell, mast cell, neutrophile, basophile, eosinophile, monocyte), megakaryocyte, synovial cell, chondrocyte, osteocyte, osteoblast, osteoclast, mammary gland cell, hepatocyte or interstitial cell, or a precursor cell therefor, stem cell or cancer cell and the like) or blood cells of a human or a mammalian animal (for example guinea-pig, rat, mouse, rabbit, swine, sheep, cattle, monkey and the like) or any tissue containing the cells listed above such as brain, brain parts (e.g., olfactory bulb, tonsillar nucleus, cerebral basal bulb, hippocampus, thalamus, hypothalamus, subthalamic nucleus, cerebral cortex, medulla oblongata, cerebellum, occipital lobe, frontal lobe, temporal lobe, putamen, caudatum, blush, nigra), spinal cord, pituitary gland, stomach, pancreas, kidney, liver, gonad, thyroid gland, gallbladder, bone marrow, adrenal gland, skin, muscle, lung, digestive tract (e.g., large intestine, small intestine), blood vessel, heart, thymus, spleen, submandibular gland, peripheral blood, peripheral blood cells, prostate, testis, orchis, ovary, placenta, uterus, bone, joint, skeletal muscle and the like (especially brain and brain parts) as well as a synthetic protein.

**[0022]** An amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1 may for example be an amino acid having about 50 % or more, preferably about 70 % or more, more preferably about 80 % or more, further preferably about 90% or more, most preferably about 95 % or more of the homology with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1.

**[0023]** Preferably, a protein comprising an amino acid sequence according to the invention which is substantially identical to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 1 may for example be a protein having an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1 and having an activity substantially similar to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1.

**[0024]** Typically, a protein comprising an amino acid sequence according to the invention which is substantially identical to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1 may for example be a protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.6.

**[0025]** An activity which is substantially similar may for example be ligand binding activity and signal data transmitting activity. The expression "substantially similar" means that the activity is qualitatively similar. Accordingly, the ligand binding activity or the signal data transmitting activity may be different in the degree of the activity or in a quantitative factor such as the molecular weight of the protein, while such activity is preferably comparable (e.g., about 0.01 to 100 times, preferably about 0.5 to 20 times, more preferably 0.5 to 2 times).

**[0026]** While the determination of activity such as ligand binding activity and signal data transmitting activity can be performed in accordance with a method known per se, a ligand determination and a screening method described below may for example be employed.

**[0027]** A receptor protein according to the invention may also be a protein having [1] an amino acid sequence formed as a result of the deletion of one or more (preferably 1 to about 30, more preferably 1 to about 10, most preferably 1 to 5) amino acids in the amino acid sequence represented by Sequence ID. NO. 1, [2] an amino acid sequence formed as a result of the addition of one or more (preferably 1 to about 30, more preferably 1 to about 10, most preferably 1 to 5) amino acids to the amino acid sequence represented by Sequence ID. NO.1, [3] an amino acid sequence formed as a result of the substitution of one or more (preferably 1 to about 30, more preferably 1 to about 10, most preferably 1 to 5) amino acids in the amino acid sequence represented by Sequence ID. NO.1 by other amino acids or [4] an amino acid or a combination thereof.

**[0028]** A receptor protein according to the invention has an N-terminal (amino terminal) in its left end and a C-terminal (carboxyl terminal) in the right end as is ordinary in peptide designation. While a receptor protein of the invention including a receptor protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1 as its representative usually has a carboxyl group (-COOH) or a carboxylate (-COO<sup>-</sup>) at its C-terminal, it may have an amide (-CONH<sub>2</sub>) or an ester (-COOR) at its C-terminal.

**[0029]** R in an ester employed here may for example be a C<sub>1-6</sub> alkyl group such as methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl and n-butyl, a C<sub>3-8</sub> cycloalkyl group such as cyclopentyl and cyclohexyl, a C<sub>6-12</sub> aryl group such as phenyl and  $\alpha$ -naphthyl and a C<sub>7-14</sub> aralkyl group including a phenyl-C<sub>1-2</sub> alkyl group such as benzyl and phenethyl and an  $\alpha$ -naphthyl-C<sub>1-2</sub> alkyl group such as  $\alpha$ -naphthylmethyl as well as a pivaloyloxymethyl group employed widely as an oral ester.

**[0030]** When a receptor protein of the invention has a carboxyl group (or carboxylate) anywhere other than its C-terminal, it may also be included in a receptor protein of the invention when such carboxyl group is amidated or esterified. The ester in such case may be an ester in the C-terminal listed above.

**[0031]** A receptor protein of the invention also includes one whose amino group in the methionine residue at the N-

terminal of a protein described above is protected by a protective group (for example, C<sub>1-6</sub> acyl group including a C<sub>2-6</sub> alkanoyl group such as formyl and acetyl groups), one whose glutamyl group generated as a result of an in vivo cleavage of the N-terminal is converted into a pyroglutamic acid, one whose substituent on a side chain of an intramolecular amino acid (for example, -OH, -SH, amino group, imidazole group, indole group, guanidino group) is protected by a suitable protective group (for example, C<sub>1-6</sub> acyl group including a C<sub>2-6</sub> alkanoyl group such as formyl and acetyl groups), or a conjugated protein such as a glycoprotein having a saccharide chain bound thereto.

[0032] Typically, a receptor protein of the invention may for example be a receptor protein derived from a human (preferably derived from a human hippocampus) comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1.

[0033] A partial peptide of a receptor protein of the invention (hereinafter sometimes abbreviated as a partial peptide) may be any partial peptide of a receptor protein of the invention described above, and may for example be a site of a receptor protein of the invention which is exposed to the outside of a cell membrane and which has a receptor binding activity.

[0034] Typically, a partial peptide of the receptor protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1 may for example be a peptide containing a part which is proven to be an extracellular region (hydrophilic site) in a hydrophobicity plot analysis shown in Figure 1. A peptide partially containing a hydrophobic site may also be similarly employed. While a peptide containing each domain discretely may also be employed, a peptide containing several domains simultaneously may also be employed.

[0035] The number of the amino acids in a partial peptide of the invention is preferably at least 20, more preferably at least 50 and most preferably at least 100, such amino acids being selected from the constituent amino acids of a receptor protein of the invention.

[0036] A substantially identical amino acid sequence means an amino acid sequence having about 50 % or more, preferably about 70 % or more, more preferably about 80 % or more, further preferably about 90 % or more and most preferably about 95 % or more of the homology with the relevant amino acid sequence.

[0037] The term "substantially similar activity" employed here has the meaning similar to that described above. A determination of such "substantially similar activity" can be performed as described above.

[0038] A partial peptide of the invention may be subjected to the deletion of one or more (preferably 1 to about 10, more preferably 1 to 5) amino acids in an amino acid sequence described above, the addition of one or more (preferably 1 to about 20, more preferably 1 to 10, further preferably 1 to 5) amino acids to the amino acid sequence and the substitution of one or more (preferably 1 to about 10, more preferably several ones, further preferably 1 to 5) amino acids in the amino acid sequence with other amino acids.

[0039] While a partial peptide of the invention usually has a carboxyl group (-COOH) or a carboxylate (-COO<sup>-</sup>) at its C-terminal, it may have an amide (-CONH<sub>2</sub>) or an ester (-COOR) at its C-terminal similarly to a protein of the invention.

[0040] A partial peptide of the invention also includes, similarly to a receptor protein of the invention, one whose amino group in the methionine residue at the N-terminal is protected by a protective group, one whose Gln as a result of an in vivo cleavage at the N-terminal formed is converted into a pyroglutamic acid, one whose substituent on a side chain of an intramolecular amino acid is protected by a suitable protective group, or a conjugated protein such as a glycoprotein having a saccharide chain bound thereto.

[0041] While a partial peptide of the invention usually has a carboxyl group (-COOH) or a carboxylate (-COO<sup>-</sup>) at its C-terminal, it may have an amide (-CONH<sub>2</sub>) or an ester (-COOR) at its C-terminal similarly to a protein of the invention.

[0042] A salt of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof may for example be a physiologically acceptable salt with an acid or a base, and a physiologically acceptable acid addition salt is preferred especially. Such salt may for example be a salt with an inorganic acid (for example, hydrochloric acid, phosphoric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid), or with an organic acid (for example, acetic acid, formic acid, propionic acid, fumaric acid, maleic acid, succinic acid, tartaric acid, citric acid, malic acid, oxalic acid, benzoic acid, methanesulfonic acid, benzenesulfonic acid).

[0043] A receptor protein of the invention or a salt thereof may be produced by a known method for purifying a protein from a cell or a tissue of human or a mammalian animal described above, or may be produced by incubating a transformant comprising a DNA encoding a receptor protein of the invention as described below. Alternatively, a protein synthesis described below or an analogous method may also be employed.

[0044] When a tissue or a cell of human or a mammalian animal is used as a starting material, it is homogenized and extracted, for example, with an acid to obtain an extract, which is then purified by a combination of chromatographic methods such as a reverse phase chromatography, an ion exchange chromatography and the like.

[0045] A receptor protein or a partial peptide of the invention or its salt or amide may usually be synthesized using a commercial protein synthesis resin. Such resin may for example be a chloromethyl resin, a hydroxymethyl resin, a benzhydrylamine resin, an aminomethyl resin, a 4-benzyloxybenzyl alcohol resin, a 4-methylbenzhydrylamine resin, a PAM resin, a 4-hydroxymethylmethylphenylacetamide resin, a polyacrylamide resin, a 4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-hydroxymethyl)phenoxy resin, a 4-(2',4'-dimethoxyphenyl)-Fmoc aminoethyl)phenoxy resin and the like. Using such resin, an amino acid whose  $\alpha$ -amino group and side chain functionalities are suitably protected is condensed on the resin



according to any condensation method known per se in the order of the sequence of an intended protein. At the end of the reaction, a protein is isolated from the resin while being deprotected simultaneously, and then subjected to an intramolecular disulfide bond forming reaction in a highly diluted solution to obtain an intended protein or its amide.

**[0046]** While the condensation of a protected amino acid described above may be effected using various activating reagents which can be employed for synthesizing a protein, a carbodiimide is employed preferably. Such carbodiimide may be DCC, N,N'-diisopropylcarbodiimide, N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and the like. For an activation using any of those listed above, a protected amino acid may be added directly to a resin together with a racemization-inhibiting auxiliary agent (for example, HOBt, HOObt), or a protected amino acid may previously be activated as a symmetric acid anhydride or an HOBt ester or an HOObt ester and then added to a resin.

**[0047]** A solvent used in an activation of a protected amino acid or in a condensation with a resin may be one selected from the solvents known to be useful in a protein condensation reaction. Those employed may for example be an acid amide such as N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide and N-methylpyrrolidone, a halogenated hydrocarbon such as methylene chloride and chloroform, an alcohol such as trifluoroethanol, a sulfoxide such as dimethylsulfoxide, an ether such as pyridine, dioxane and tetrahydrofuran, a nitrile such as acetonitrile and propionitrile, an ester such as methyl acetate and ethyl acetate, or a mixture thereof. The reaction temperature may appropriately be selected from the range known to be useful in a protein binding reaction, and may usually range from -20°C to 50°C. An activated amino acid derivative is employed usually in excess of 1.5 to 4 times. When a ninhydrin reaction test revealed an insufficient condensation, the condensation is repeated without any deprotection to achieve a sufficient condensation. When a repetitive condensation is still not successful in achieving a sufficient condensation, acetic anhydride or acetylimidazole may be employed for acetylating an unreacted amino acid.

**[0048]** A protective group for an amino group of a starting material may for example be Z, Boc, t-pentyloxycarbonyl, isobornyloxycarbonyl, 4-methoxybenzyloxycarbonyl, Cl-Z, Br-Z, adamantyloxycarbonyl, trifluoroacetyl, phthaloyl, formyl, 2-nitrophenylsulfonyl, diphenylphosphonothioyl, Fmoc and the like.

**[0049]** A carboxyl group can be protected for example by an alkylesterification (for example a straight, branched or cyclic alkylesterification employing methyl, ethyl, propyl, butyl, t-butyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl, cyclooctyl, 2-adamantyl and the like), an aralkylesterification (for example benzylerification, 4-nitrobenzylerification, 4-methoxybenzylerification, 4-chlorobenzylerification, benzhydrylerification), phenacylerification and can also be protected as benzyloxycarbonylhydrazide, t-butoxycarbonylhydrazide, tritylhydrazide and the like.

**[0050]** The hydroxyl group of serine can be protected for example by an esterification or an etherification. A group suitable in such esterification may for example be a lower alkanoyl group such as an acetyl group, an aroyl group such as a benzoyl group, or a group derivatized from carbonic acid such as a benzyloxycarbonyl group and an ethoxycarbonyl group. A group suitable in such etherification may for example be a benzyl, tetrahydropyranyl and t-butyl groups.

**[0051]** A protective group for a phenolic hydroxyl group of tyrosine may for example be Bzl, Cl<sub>2</sub>-Bzl, 2-nitrobenzyl, Br-Z, t-butyl and the like.

**[0052]** A protective group for imidazole of histidine may for example be Tos, 4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulfonyl, DNP, benzyloxymethyl, Bum, Boc, Trt, Fmoc and the like.

**[0053]** A starting substance whose carboxyl group is activated may for example be a corresponding acid anhydride, an azide, an activated ester [ester with alcohol (for example pentachlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 2,4-dinitrophenol, cyanomethyl alcohol, p-nitrophenol, HONB, N-hydroxysuccinimide, N-hydroxyphthalimide, HOBT)]. A starting substance whose amino group is activated may for example be a corresponding phosphoryl amide.

**[0054]** A method for a deprotection (cleavage) may be a catalytic hydrogenation under a hydrogen flow in the presence of a catalyst such as Pd-black or Pd-C, a treatment with an acid such as anhydrous hydrofluoric acid, methanesulfonic acid, trifluoromethanesulfonic acid, trifluoroacetic acid or a mixture thereof, a treatment with a base such as diisopropylethylamine, triethylamine, piperidine, piperazine and the like, as well as a reduction with sodium in a liquid ammonia. A cleavage employing an acid treatment described above is performed usually at a temperature of -20°C to 40°C, and such acid treatment is effected advantageously by adding a cation scavenger such as anisol, phenol, thioanisole, m-cresol, p-cresol, dimethylsulfide, 1,4-butanedithiol, 1,2-ethanedithiol and the like. A 2,4-dinitrophenyl group employed as an imidazole protective group for histidine is deprotected by a thiophenol treatment, while a formyl group employed as an indole protective group of tryptophan is removed by a deprotection using an acid treatment in the presence of 1,2-ethanedithiol and 1,4-butanedithiol as described above and also by a treatment with an alkali such as a dilute solution of sodium hydroxide and a dilute ammonia.

**[0055]** A protection of a functional group which should not be involved in a reaction of starting materials, a protective group therefor, a deprotection of such protective group and an activation of a functional group involved in a reaction may appropriately be selected from the groups and the methods known per se.

**[0056]** In an alternative method for obtaining an amide of a protein, the  $\alpha$ -carboxyl group of the amino acid at the carboxy terminal may for example be protected as being amidated, and then a peptide chain (protein) is elongated to a desired length in the direction of its amino group, and then a protein from which only the protection group of the  $\alpha$ -amino group at the N-terminal of the peptide is removed and a protein from which only the protection group of the

carboxyl group at the C-terminal thereof is removed are produced, and the both proteins are condensed in a solvent mixture described above. Such condensation is detailed above. After purifying a protected protein obtained by the condensation, all protective groups are removed by the methods described above to yield a desired crude protein. This crude protein can be purified by any of the known purification means and a target fraction is lyophilized to obtain an amide of the desired protein.

**[0057]** For obtaining an ester of a protein, the  $\alpha$ -carboxyl group of the amino acid at the carboxy terminal may for example be condensed with a desired alcohol to form an amino acid ester, which is converted into an ester of a desired protein similarly to an amide of a protein.

**[0058]** A partial peptide of a protein of the invention or its salt can be produced according to a peptide synthesis method known per se or by cleaving a protein of the invention with an appropriate peptidase. Such peptide synthesis method may be a solid phase synthesis or a liquid phase synthesis. Thus, a partial peptide or an amino acid capable of constituting a protein of the invention is condensed with the remainder moiety and then a protective group, if any, of the product is removed to obtain an intended peptide. Examples of the known condensation methods and deprotection methods are described in References [1] to [5] shown below.

[1] M. Bodanszky and M. A. Ondetti, Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966);

[2] Schroeder and Luebke, The Peptide, Academic Press, New York (1965);

[3] N. Izumiya et al, Basics and experiments of peptide synthesis, Maruzen (1975);

[4] H. Yajima et al, Biochemistry experiment 1, Protein chemistry IV, 205 (1977);

[5] H. Yajima (supervision), Pharmaceutical development II, Vol. 14, Peptide synthesis, Hirokawa Shoten.

**[0059]** After the reaction, a partial peptide of the invention can be isolated and purified by a combination of a solvent extraction, a distillation, a column chromatography, a liquid chromatography, a recrystallization and the like. When the partial peptide thus obtained is in a free form then it can be converted into a suitable salt by a known method, and when the product is a salt then it can be converted into a free form or other salts by a known method.

**[0060]** A polynucleotide encoding a receptor protein of the invention may be any polynucleotide comprising a base sequence (DNA or RNA, preferably DNA) which encodes the receptor protein of the invention described above. Such polynucleotide may be a DNA or an RNA such as an mRNA which encodes a receptor protein of the invention, and which may be double-stranded or single-stranded. A double-stranded polynucleotide may be a double-stranded DNA, a double-stranded RNA or a hybrid of DNA:RNA. A single-stranded polynucleotide may be a sense (i.e., encoding) strand or an antisense (i.e., non-encoding) strand.

**[0061]** A DNA encoding a receptor protein of the invention may be a genome DNA, a genome DNA library, a cDNA derived from a cell or a tissue described above, a cDNA library derived from a cell or a tissue described above and a synthetic DNA. A vector employed to obtain a library may be a bacteriophage, a plasmid, a cosmid, a phagimide and the like. A total RNA or an mRNA fraction prepared from a cell or a tissue described above may also be used directly in an amplification by a reverse transcriptase polymerase chain reaction (hereinafter abbreviated as RT-PCR).

**[0062]** Typically, a DNA encoding a receptor protein of the invention may for example be a DNA comprising the base sequence represented by SEQ ID NOs. 2, 3 or 7 or a DNA having a base sequence capable of being hybridized under a high stringent condition with the base sequence represented by SEQ ID NO. 2, 3 or 7 and encoding a receptor protein having an activity substantially similar to that of the protein of the invention (e.g., ligand binding activity, signal data transmitting activity).

**[0063]** A DNA capable of being hybridized with the base sequence represented by SEQ ID NO. 2, 3 or 7 may for example be a DNA having about 70 % or more, preferably about 80 % or more, more preferably about 90 % or more and most preferably about 95 % or more of the homology with the base sequence represented by SEQ ID NO. 2, 3 or 7.

**[0064]** As evident also from Examples 1 to 3 described below, the presence of a DNA comprising a base sequence represented by SEQ ID NO. 2, 3 or 7 suggests a genetic polymorphism, which enables an application to a diagnostic agent described below.

**[0065]** A hybridization can be performed by a method known per se or its modification, for example, a method described in Molecular Cloning, 2nd, J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press (1989). When a commercial library is employed, an attached instruction may be followed. More preferably, a high stringent condition is employed.

**[0066]** Such high stringent condition may for example be one employing a sodium concentration of about 19 to 40 mM, preferably about 19 to 20 mM and a temperature of about 50 to 70°C, preferably about 60 to 65°C. A sodium concentration of about 19 mM combined with a temperature of about 65°C is most preferred.

**[0067]** More typically, a DNA encoding a receptor protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 1 may be a DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO. 2 or 3, and a DNA encoding a receptor protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 6 may be a DNA having the base sequence represented by SEQ ID NO. 7.

**[0068]** A polynucleotide comprising a part of the base sequence of a DNA encoding a receptor protein of the invention



or a part of the base sequence complementary with such DNA is intended not only to comprise the DNA encoding a partial peptide of the invention described above but also to comprise an RNA.

**[0069]** According to the invention, an antisense polynucleotide (nucleic acid) capable of inhibiting the replication or the expression of a G-protein coupled receptor protein gene can be designed and synthesized based on the base sequence data of a DNA which is cloned or encodes a determined G-protein coupled receptor protein. Such polynucleotide (nucleic acid) can be hybridized with an RNA of a G-protein coupled receptor protein gene whereby inhibiting the synthesis or the function of such RNA, or can interact with a G-protein coupled receptor protein-related RNA whereby regulating or controlling the expression of a G-protein coupled receptor protein gene. By using a polynucleotide complementary with a selected sequence of a G-protein coupled receptor protein-related RNA and a polynucleotide capable of being hybridized specifically with such G-protein coupled receptor protein-related RNA, an in vivo or in vitro determination or regulation of such G-protein coupled receptor protein gene (for controlling an excessive expression or enhancing the expression as desired) can be achieved in accordance with a method known per se. Thus, an application can be made to the diagnosis and the prophylaxis or the therapy for a disease related to the deficiency or the dysfunction of such G-protein coupled receptor protein. The expression "corresponding to" is used herein to mean a homology to or a complementarity with a certain sequence of a nucleotide including a gene, a base or a nucleic acid. The expression "corresponding to" when used here in the context of the relationship of a nucleotide, a base sequence and a peptide (protein) usually means an amino acid of a peptide (protein) to be derived from the nucleotide (nucleic acid) sequence or a sequence complementary therewith. While a 5'-end hairpin loop, a 5'-end 6 base pair repeat, a 5'-end non-coding region, a polypeptide translation initiation codon, a protein-encoding region, an ORF translation initiation codon, a 3'-end non-coding region, a 3'-end palindrome region and a 3'-end hairpin loop of a G-protein coupled receptor protein gene can be selected as a preferred target region, any region in the G-protein coupled receptor protein gene can also be selected as a target region.

**[0070]** The relationship between an intended nucleic acid and a polynucleotide complementary with at least a part of a target region, i.e., the relationship with a polynucleotide capable of being hybridized with a target can be regarded to be "antisense". An antisense polynucleotide may for example be a polydeoxynucleotide containing 2-deoxy-D-ribose, a polydeoxynucleotide containing D-ribose, a polynucleotide of any other type which is an N-glycoside of a purine or pyrimidine base, any other polymer containing a non-nucleotide backbone (for example, a commercially available protein nucleic acid and a synthetic sequence-specific nucleic acid polymer) or any other polymer containing a special binding (provided that such polymer contains a nucleotide having a configuration capable of accepting a base pairing or a base adhesion found in a DNA or an RNA). It may be a double-stranded DNA, a single-stranded DNA, a double-stranded RNA, a single-stranded RNA, a DNA:RNA hybrid, a non-modified polynucleotide (or a non-modified oligonucleotide), a polynucleotide having a known modification, for example, one having a known label, a capped polynucleotide, a methylated polynucleotide, a polynucleotide obtained by substituting one or more natural nucleotides with analogues, a polynucleotide whose intramolecular nucleotides are modified, for example, one having a non-charged bond (for example, methylphosphonate, phosphotriester, phosphoramidate, carbamate), one having a charged bond or a sulfur-containing bond (for example, phosphorothioate, phosphorodithioate), for example, one having a side chain residue such as a protein (nuclease, nuclease inhibitor, toxin, antibody, signal peptide, poly-L-lysine) or a saccharide (for example, monosaccharide), one having an intercalating compound (for example, acridine, psoralen), one containing a chelating compound (for example, metal, radioactive metal, boron, oxidativemetal), one containing an alkylating agent, one having a modified bond (for example,  $\alpha$ -anomer nucleic acid) and the like. The terms "nucleoside", "nucleotide" and "nucleic acid" employed here may include a form containing not only purine and pyrimidine bases but also other modified heterocyclic bases. Such modified form may contain methylated purine and pyrimidine, acylated purine and pyrimidine as well as other heterocyclic rings. A modified nucleoside and a modified nucleotide may be modified further at their saccharide moieties, for example, as a result of the substitution of one or more hydroxyl groups by halogens or aliphatic groups, or as a result of the conversion into a functional group such as an ether or an amine.

**[0071]** An antisense polynucleotide (nucleic acid) of the invention is an RNA, a DNA, or a modified nucleic acid (RNA, DNA). Typically, such modified nucleic acid may for example be a sulfur derivative or a thiophosphate derivative of a nucleic acid and those which are resistant to a polynucleosideamide or oligonucleosideamide degradation, others may also be employed. An antisense nucleic acid of the invention can preferably be designed based on the policy described below. Thus, an effort is made for the purpose of achieving a higher intracellular stability of an antisense nucleic acid, a higher cellular permeability of an antisense nucleic acid, a higher affinity with a target sense strand, and a lower toxicity, if any, of an antisense nucleic acid.

**[0072]** Such modifications are reported extensively in this field, as disclosed for example in J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol.8, pp.247, 1992; Vol.8, pp.395, 1992; S.T. Croke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993.

**[0073]** An antisense nucleic acid of the invention can be imparted with a variation or may contain a modified saccharide, base or bond, and can be provided in a special form such as a liposome or a microsphere, applied to an gene therapy or can be given as an adduct. Such adduct may be a polycation such as a polylysine which serves to neutralize

the electric charge of a phosphate backbone or a hydrophobic material such as a lipid (for example, phospholipid, cholesterol) which serves to enhance the interaction with a cell membrane and to promote the intake of a nucleic acid. A lipid to be added preferably is cholesterol or a derivative thereof (for example, cholesteryl chloroformate, cholic acid) and the like. These are capable of being attached to the 3'- or 5'-end of a nucleic acid, and can be attached via a base, a saccharide or an intracellular nucleoside bond. Other groups may for example be a group for a capping located specifically at the 3'- or 5'-end of a nucleic acid, such as those intended to avoid the degradation by a nuclease such as exonucleases or RNases. A group for such capping may be a protective group for a hydroxyl group known in the art such as a glycol including polyethylene glycol and tetraethylene glycol, which are not limiting.

[0074] The inhibitory activity of an antisense nucleic acid can be examined using a transformant of the invention, an in vivo or in vitro gene expression system of the invention or an in vivo or in vitro translation system of a G-protein coupled receptor protein. Such nucleic acid can be applied to a cell by a method known per se.

[0075] A DNA encoding a partial peptide of the invention may be any DNA containing a base sequence encoding a partial peptide of the invention described above. It may be a genome DNA, a genome DNA library, a cDNA derived from a cell or a tissue described above, a cDNA library derived from a cell or a tissue described above and a synthetic DNA. A vector employed to obtain a library may be a bacteriophage, a plasmid, a cosmid, a phagemid and the like. An mRNA fraction prepared from a cell or a tissue described above may also be used directly in an amplification by a reverse transcriptase polymerase chain reaction (hereinafter abbreviated as RT-PCR).

[0076] Typically, a DNA encoding a partial peptide of the invention may for example be [1] a DNA having a partial base sequence of a DNA comprising the base sequence represented by SEQ ID NOs.2, 3 or 7 or [2] a DNA having a partial base sequence of a DNA having a base sequence capable of being hybridized under a high stringent condition with the base sequence represented by SEQ ID NO.2, 3 or 7 and encoding a receptor protein having an activity substantially similar to that of the protein of the invention (e.g., ligand binding activity, signal data transmitting activity).

[0077] A DNA capable of being hybridized with the base sequence represented by SEQ ID NO.2, 3 or 7 may for example be a DNA having about 70 % or more, preferably about 80 % or more, more preferably about 90 % or more and most preferably about 95 % or more of the homology with the base sequence represented by SEQ ID NO.2, 3 or 7.

[0078] In a method for cloning a DNA which completely encodes a receptor protein or a partial peptide thereof according to the invention (hereinafter abbreviated as a receptor protein of the invention) a synthetic DNA primer having a partial base sequence of the receptor protein of the invention is employed in an amplification by a PCR, or a selection is made by means of a hybridization of a DNA integrated into a suitable vector and labeled with a DNA fragment encoding a part or all of the receptor protein of the invention or with a synthetic DNA. A hybridization can be performed for example by a method described in Molecular Cloning, 2nd, J.Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press (1989). When a commercial library is employed, an attached instruction may be followed.

[0079] The conversion of the base sequence of a DNA can be performed by a method known per se such as Gapped duplex method or Kunkel method or its modification using a known kit, such as Mutan™-G (Takara) or Mutan™-K (Takara).

[0080] A cloned receptor protein-encoding DNA can be used directly or after a digestion with a restriction enzyme or an addition of a linker if desired. Such DNA may have an ATG as a translation initiation codon at its 5' terminal and a TAA, TGA or TAG as a translation termination codon at its 3' terminal. Such translation initiation codon or termination codon may be added using an appropriate synthetic DNA adapter.

[0081] An expression vector for a receptor protein of the invention can be prepared for example by (i) cutting a desired DNA fragment out of a DNA encoding the receptor protein of the invention, and (ii) ligating said DNA fragment to the downstream of a promoter of a suitable expression vector.

[0082] Such vector may for example be an E.coli-derived plasmid (e.g., pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), a B. subtilis-derived plasmid (e.g., pUB110, pTP5, pCI94), a yeast-derived plasmid (e.g., pSH19, pSH15), a bacteriophage such as  $\lambda$  phage, an animal virus such as retrovirus, vaccinia virus, baculovirus and the like, as well as pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo and the like.

[0083] A promoter employed in the invention may be any promoter which is appropriate correspondingly to a host employed for expressing a gene. For example, when an animal cell is employed as a host cell, those exemplified are SR $\alpha$  promoter, SV40 promoter, LTR promoter, CMV promoter, HSV-TK promoter and the like.

[0084] Among those listed above, CMV promoter and SR $\alpha$  promoter are employed preferably. Those preferred for an Escherichia microorganism as a host cell are trp promoter, lac promoter, recA promoter,  $\lambda$ P<sub>L</sub> promoter, lpp promoter and the like, those preferred for a Bacillus microorganism as a host cell are SPO1 promoter, SPO2 promoter, penP promoter and the like, those preferred for a yeast as a host cell are PHO5 promoter, PGK promoter, GAP promoter, ADH promoter and the like. Those preferred for an insect cell as a host cell are polyhedrin promoter, p10 promoter and the like.

[0085] In addition to those described above, an expression vector containing, if desired, an enhancer, a splicing signal, a polyA addition signal, a selection marker, an SV 40 replication origin (hereinafter sometimes abbreviated as SV40ori) and the like may also be employed. A selection marker may for example be a dihydrofolate acid reductase

(hereinafter sometimes abbreviated as dhfr) gene [methotrexate (MTX) resistant], an ampicillin resistant gene (hereinafter sometimes abbreviated as Amp<sup>r</sup>), a neomycin resistant gene (hereinafter sometimes abbreviated as Neo<sup>r</sup>, G418 resistant) and the like. Especially when a dhfr gene is employed as a selection marker using a CHO (dhfr) cell, an intended gene can be selected using a thymidine-fr e medium.

**[0086]** A signal sequence suitable for a host cell may also be added if necessary to the N-terminal of a receptor protein of the invention. Those preferred for an *Escherichia* microorganism as a host cell are Pho A-signal sequence, Omp A-signal sequence and the like, those preferred for a *Bacillus* microorganism as a host cell are  $\alpha$ -amylase-signal sequence, subtilisin-signal sequence and the like, those preferred for a yeast as a host cell are MF $\alpha$ -signal sequence, SUS2-signal sequence and the like, and those preferred for an animal cell as a host cell are insulin-signal sequence,  $\alpha$ -interferon-signal sequence, an antibody molecule-signal sequence and the like.

**[0087]** Using a vector comprising a DNA encoding a receptor protein of the invention thus constructed, a transformant can be prepared.

**[0088]** A host cell may for example be an *Escherichia* microorganism, a *Bacillus* microorganism, a yeast, an insect cell, an insect, an animal cell and the like.

**[0089]** Such *Escherichia* microorganism may for example be *Escherichia coli* K12-DH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 60, 160 (1968)), JM103 (Nucleic Acids Research, Vol.9, 309 (1981)), JA221 (Journal of Molecular Biology, Vol. 120, 517 (1978)), HB101 (Journal of Molecular Biology, Vol.41, 459 (1969)), C600 (Genetics, Vol.39, 440 (1954)) and the like.

**[0090]** A *Bacillus* microorganism may for example be *Bacillus subtilis* MI114 (Gene, Vol.24, 255 (1983)), 207-21 (Journal of Biochemistry, Vol.95, 87 (1984)) and the like.

**[0091]** A yeast may for example be *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, *Schizosaccharomyces pombe* NCYC1913, NCYC2036, *Pichia pastoris* KM71 and the like.

**[0092]** An insect cell, when a virus is AcNPV, may for example be an armyworm-derived cultured cell line, (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf cell), a *Trichoplusia ni* mesenteron-derived MG1 cell, *Trichoplusia ni* egg-derived High Five<sup>TM</sup> cell, *Mamestrabracassicae*-derived cell, *Estigmena acrea*-derived cell and the like. A cell when a virus is BmNPV may for example be a silkworm-derived cultured cell line (*Bombyx mori* N cell; BmN cell) and the like. Such Sf cell may for example be an Sf9 cell (ATCC CRL1711), an Sf21 cell (for both, see Vaughn, J.L. et al., In Vivo, 13, 213-217 (1977)) and the like.

**[0093]** An insect may for example be a larva of a silkworm (Maeda et al., Nature, Vol.315, 592 (1985)).

**[0094]** An animal cell may for example be a simian cell COS-7, V ero, a Chinese hamster cell CHO (hereinafter abbreviated as CHO cell), a dhfr gene-defect Chinese hamster cell CHO (hereinafter abbreviated as CHO (dhfr) cell), amouseLcell, a mouse AtT-20, a mouse myeloma cell, a rat GH3, a human FL cell and the like.

**[0095]** An *Escherichia* microorganism can be transformed for example by a method described in Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 69, 2110 (1972), or Gene, Vol.17, 107 (1982). A *Bacillus* microorganism can be transformed for example by a method described in Molecular and General Genetics, Vol.168, 111 (1979).

**[0096]** A yeast can be transformed for example by a method described in Methods in Enzymology, Vol. 194, 182-187 (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.75, 1929 (1978) and the like.

**[0097]** An insect cell or an insect can be transformed for example by a method described in Bio/Technology, 6, 47-55 (1988).

**[0098]** An animal cell can be transformed for example by a method described in CELL ENGINEERING EXTRA ISSUE No.8, NEW CELL ENGINEERING PROTOCOL, 263-267 (1995) (SHUJUNSHA), Virology, VI.52, 456 (1973) and the like.

**[0099]** As described above, a transformant which had been transformed with an expression vector comprising a DNA encoding a G-protein coupled receptor protein can be obtained.

**[0100]** When incubating a transformant whose host cell is an *Escherichia* microorganism or a *Bacillus* microorganism, a suitable culture medium employed is a liquid medium which may contain substances required for the growth of the relevant transformant such as carbon sources, nitrogen sources, inorganic substances and the like. A carbon source may for example be glucose, dextrin, soluble starch, sucrose and the like, and a nitrogen source may for example be an inorganic or organic material such as an ammonium salt, a nitrate, corn steep liquor, peptone, casein, meat extract, soybean bran, potato extract and the like, and an inorganic substance may for example be calcium chloride, sodium dihydrogen phosphate, magnesium chloride and the like. A yeast, a vitamin and a growth promoting factor may also be added. The pH of a medium is preferably about 5 to 8.

**[0101]** A preferred culture medium for incubating an *Escherichia* microorganism may for example be a M9 medium containing glucose and casamino acid (Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)). If necessary, a medium may contain an agent for facilitating the action of a promoter such as 3 $\beta$ -indolylacrylic acid. When an *Escherichia* microorganism is employed as a host cell, the incubation is performed usually at 15 to 43°C for about 3 to 24 hours, if necessary with aeration or stirring.

**[0102]** When a *Bacillus* microorganism is employed as a host cell, the incubation is performed usually at 30 to 40°C

for about 6 to 24 hours, if necessary with aeration or stirring.

[0103] When incubating a transformant whose host cell is a yeast, a suitable culture medium employed may for example be a Burkholder minimum medium (Bostian, K.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, 4505 (1980), and a 0.5 % casamino acid-supplemented SD medium (Bitter, G.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 81, 5330 (1984). The pH of a culture medium is adjusted preferably at about 5 to 8. The incubation is performed usually at 20 to 35°C for about 24 to 72 hours, if necessary with aeration or stirring.

[0104] When incubating a transformant whose host cell is an insect cell or an insect, a suitable culture medium employed may for example be Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., Nature, 195, 788 (1962) supplemented appropriately, for example, with an inactivated 10 % bovine serum. The pH of the culture medium is adjusted preferably at about 6.2 to 6.4. The incubation is performed usually at 27°C for about 3 to 5 days, if necessary with aeration or stirring.

[0105] When incubating a transformant whose host cell is an animal cell, a suitable culture medium employed may for example be a MEM medium supplemented with about 5 to 20 % fetal bovine serum (Science, Vol. 122, 501 (1952), a DMEM medium (Virology, Vol. 8, 396 (1959), an RPMI1640 medium (The Journal of the American Medical Association, Vol. 199, 519 (1967), a 199 medium (Proceedings of the Society for the Biological Medicine, Vol. 73, 1 (1950), and the like. The pH of a culture medium is preferably about 6 to 8. The incubation is performed usually at 30 to 40°C for about 15 to 60 hours, if necessary with aeration or stirring.

[0106] As described above, a G-protein coupled receptor protein according to the invention can be produced in a cell membrane of a transformant.

[0107] In order to separate and purify a receptor protein of the invention from a cell culture described above, a method described below may for example be employed.

[0108] For extracting a receptor protein of the invention from a cultured microorganism or a cultured cell, the cell is collected by a known method after incubation and suspended in a suitable buffer solution, which is subjected to ultrasonication, treatment with lysozyme and/or a freezing and thawing cycle to destroy the cell followed by centrifugation or filtration to obtain a crude extract of the receptor protein. The buffer solution may contain a protein modifier such as urea or guanidine hydrochloride or a surfactant such as Triton X-100™. When a receptor protein is secreted into a culture medium, then a cell and a supernatant are separated by a method known per se after completing the incubation to collect the supernatant.

[0109] The purification of a receptor protein contained in a culture supernatant or an extract thus obtained may be performed by an appropriate combination of separation and purification methods known per se. Such known separation and purification methods are a method utilizing solubility such as salting out or solvent precipitation, a method mainly utilizing the difference in the molecular weight such as dialysis, ultrafiltration, gel filtration and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, a method utilizing the difference in the electric charge such as ion exchange chromatography, a method utilizing the specific affinity such as affinity chromatography, a method utilizing the difference in the hydrophobicity such as reverse phase high pressure liquid chromatography, a method utilizing the difference in the isoelectric point such as isoelectric focusing and the like.

[0110] When a receptor protein thus obtained is in a free form then it can be converted into a salt by a method known per se or its modification, and, on the contrary, when it is obtained as a salt then it can be converted into a free form or another salt by a method known per se or its modification.

[0111] It is also possible that a receptor protein produced by a recombinant is treated with a suitable protein-modifying enzyme before or after a purification to achieve a desired modification or a partial removal of a polypeptide. Such protein-modifying enzyme may for example be trypsin, chymotrypsin, arginylendopeptidase, protein kinase, glycosidase and the like.

[0112] A receptor protein of the invention or its salt thus produced can be examined for its activity for example by a labeled ligand binding test or an enzyme immunoassay employing a specific antibody.

[0113] An antibody against a receptor protein or a partial peptide of the invention or its salt may be either a polyclonal antibody or a monoclonal antibody provided that it can recognize such receptor protein or partial peptide of the invention or its salt.

[0114] An antibody against a receptor protein or a partial peptide of the invention or its salt (hereinafter abbreviated as a receptor protein of the invention) can be produced using the receptor protein of the invention as an antigen by a known method for producing an antibody or antiserum.

#### [Monoclonal antibody preparation]

##### (a) Preparation of monoclonal antibody-producing cell

[0115] A receptor protein of the invention can be administered as it is or in combination with a carrier or diluent to a site where the antibody can be produced in response to the administration to a mammalian animal. The administration may be combined with an administration of a Freund's complete adjuvant or a Freund's incomplete adjuvant for the

purpose of enhancing the antibody-producing ability. The administration is performed usually once per 2 to 6 weeks, 2 to 10 times in total. A mammalian animal employed may for example be monkey, rabbit, dog, guinea-pig, mouse, rat, sheep and goat, with mouse and rat being employed preferably.

[0116] For preparing a monoclonal antibody-producing cell, antigen-immunized warm-blooded animals, for example mice, are screened for an individual exhibiting an antibody titre, from which a spleen or a lymph node is extracted 2 to 5 days after the final immunization, and an antibody-producing cell contained therein is fused with a myeloma cell, whereby preparing a monoclonal antibody-producing hybridoma. The antibody titre of an antiserum can be determined for example by reacting a labeled receptor protein described below with the antiserum followed by determining the activity of the label bound to an antibody. The fusion can be accomplished by a known method such as one by Kohler and Milstein (Nature, 256, 495 (1975)). A fusion promoting agent may for example be a polyethylene glycol (PEG) or Sendai virus, with PEG being employed preferably.

[0117] A myeloma cell may for example be NS-1, P3U1, SP2/0, with P3U1 being employed preferably. A preferred ratio of the antibody-producing cell count (spleen cell count) and the myeloma cell count employed is about 1:1 to 20:1, and an efficient cell fusion is accomplished by adding a PEG (preferably PEG 1000 to PEG 6000) at a concentration of 10 to 80 % and incubating at 20 to 40°C, preferably 30 to 37° C, for 1 to 10 minutes.

[0118] While various methods are applicable in screening for a monoclonal antibody-producing hybridoma, those which may be exemplified are a method involving an addition of a hybridoma culture supernatant to a solid phase (e. g., a microplate) on which an antigen such as a receptor protein is adsorbed directly or in combination with a carrier followed by an addition of an anti-immunoglobulin labeled with a radioactive substance or with an enzyme (anti-mouse immunoglobulin antibody is employed when the cell employed in the cell fusion is a mouse cell) or protein A whereby detecting a monoclonal antibody bound to the solid phase, or a method involving an addition of a hybridoma culture supernatant to a solid phase on which an anti-immunoglobulin antibody or protein A is absorbed followed by an addition of a receptor protein labeled with a radioactive substance or with an enzyme whereby detecting a monoclonal antibody bound to the solid phase.

[0119] While a monoclonal antibody can be selected by a method known per se or its modification, a HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine)-supplemented medium for an animal cell culture is usually employed. A medium for selection and breeding may be any medium capable of growing a hybridoma. For example, an RPMI 1640 medium supplemented with 1 to 20 %, preferably 10 to 20 % fetal bovine serum, a GIT medium (Wako Pure Chemical) supplemented with 1 to 10 % fetal bovine serum and a serum-free medium for incubating a hybridoma (SFM-101, NISSUI SEIYAKU) may be employed. The incubation temperature is usually 20 to 40°C, preferably about 37°C. The incubation time is usually 5 days to 3 weeks, preferably 1 week to 2 weeks. The incubation may be performed usually under an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> gas. The antibody titre of a hybridoma incubation supernatant can be determined similarly to an antibody titre of an antiserum described above.

#### (b) Purification of monoclonal antibody

[0120] A monoclonal antibody can be separated and purified, similarly to a standard method for separating and purifying a polyclonal antibody, such as a method for separating and purifying an immunoglobulin [e.g., salting out, alcohol precipitation, isoelectric precipitation, electrophoresis, ion exchanger (e.g., DEAE) adsorption and desorption, ultracentrifugation, gel filtration, a specific purification for collecting an antibody exclusively using an antigen-binding solid phase or an active adsorbent such as protein A or protein G followed by dissociating the binding to obtain the antibody].

#### [Polyclonal antibody preparation]

[0121] A polyclonal antibody of the invention can be prepared by a method known per se or its modification. For example, a complex of an immune antigen (antigen such as a receptor protein) with a carrier protein is produced and used as described above in the section of the monoclonal antibody preparation to immunize a mammalian animal, from which a material containing an antibody against a receptor protein of the invention is isolated and purified to obtain an antibody.

[0122] With regard to a complex of an immune antigen with a carrier protein employed for immunizing a mammalian animal, the type of the carrier protein and the mixing ratio of the carrier and a hapten may vary provided that the antibody can be produced efficiently in relation to the hapten crosslinked to the carrier for the immunization, and any substance can be crosslinked at any ratio, and, in a typical method, about 0.1 to 20, preferably about 1 to 5 of parts by weight of bovine serum albumin, bovine thyroglobulin or keyhole limpet hemocyanin is coupled to 1 part by weight of a hapten.

[0123] For coupling a hapten to a carrier, various condensing agent can be employed, such as glutaraldehyde or carbodiimide, a maleimide activated ester, an active ester reagent having a thiol group or a dithiopyridyl group.

**[0124]** A condensation product may can be administered as it is or in combination with a carrier or diluent to a site of a warm-blooded animal where the antibody can be produced. The administration may be combined with an administration of a Freund's complete adjuvant or a Freund's incomplete adjuvant for the purpose of enhancing the antibody-producing ability. The administration is performed usually once per 2 to 6 weeks, 3 to 10 times in total.

**[0125]** A polyclonal antibody can be collected from blood, ascites, preferably from blood, of a warm-blooded animal immunized as described above.

**[0126]** The polyclonal antibody titre of an antiserum can be determined similarly to the measurement of the antibody titre of an antiserum described above. A polyclonal antibody can be isolated and purified in accordance with a method for isolating and purifying an immunoglobulin similar to a method for isolating and purifying a monoclonal antibody described above.

**[0127]** A receptor protein of the invention or a salt thereof, a partial peptide thereof or a salt thereof and a DNA encoding such receptor protein or a partial peptide thereof can be used in (1) the determination of a ligand (agonist) for a G-protein coupled receptor protein of the invention, (2) a preventing and/or treating agent against a disease related to the dysfunction of a G-protein coupled receptor protein of the invention, (3) a gene diagnostic agent, (4) a method for screening a compound capable of altering the expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof, (5) a preventing and/or treating agent against various diseases containing a compound capable of altering the expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof, (6) a method for quantifying a ligand for a G-protein coupled receptor protein of the invention, (7) a method for screening a compound (agonist, antagonist) capable of altering the binding affinity between a G-protein coupled receptor protein of the invention and a ligand, (8) a preventing and/or treating agent against various diseases containing a compound (agonist, antagonist) capable of altering the binding affinity between a G-protein coupled receptor protein of the invention and a ligand, (9) a quantification of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof or a salt thereof, (10) a method for screening a compound capable of altering the amount of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane, (11) a preventing and/or treating agent against various diseases containing a compound capable of altering the amount of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane, (12) the neutralization of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof or a salt thereof by an antibody, and (13) the creation of a non-human animal having a DNA encoding a G-protein coupled receptor protein of the invention.

**[0128]** Especially by using a receptor binding assay system employing an inventive recombinant G-protein coupled receptor protein expression system, a compound (e.g., agonist and antagonist) altering the binding affinity of a ligand to a human- or mammal-specific G-protein coupled receptor can be screened and such agonist or antagonist can be employed in a preventing or treating agent against any relevant disease.

**[0129]** The uses of a receptor protein of the invention or a partial peptide or a salt thereof (hereinafter sometimes abbreviated as a receptor protein and the like of the invention), a DNA encoding a receptor protein of the invention or a partial peptide or a salt thereof (hereinafter sometimes abbreviated as a DNA of the invention) and an antibody directed to a receptor protein and the like of the invention (hereinafter sometimes abbreviated as an antibody of the invention) are discussed below.

#### (1) Determination of ligand (agonist) for G-protein coupled receptor protein of the invention

**[0130]** A receptor protein of the invention or a salt thereof or a partial peptide of the invention or a salt thereof is useful as a reagent for searching for or determining a ligand (agonist) for a receptor protein of the invention or a salt thereof.

**[0131]** Thus, the present invention provides a method for determining a ligand for a receptor protein of the invention comprising bringing a receptor protein of the invention or a salt thereof or a partial peptide of the invention or a salt thereof into contact with a test compound.

**[0132]** Such test compound may for example be a known ligand (for example, angiotensin, bombesin, cannabinoid, cholecystokinin, glutamin, serotonin, melatonin, neuropeptide Y, opioid, purine, vasopressin, oxytocin, PACAP, secretin, glucagon, calcitonin, adrenomedullin, somatostatin, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, VIP (vasoactive intestinal and related polypeptide), somatostatin, dopamine, motilin, amylin, bradykinin, CGRP (calcitonin gene-related peptide), leucotriene, pancreastatin, prostaglandine, thromboxane, adenosine, adrenaline,  $\alpha$  and  $\beta$ -chemokine (for example, IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, NIP1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES and the like), endocrine, enterogastrin, histamine, neurotensin, TRH, pancreatic polypeptide or galanin) as well as an extract of a tissue of a human or a mammalian animal (for example, mouse, rat, swine, cattle, sheep and monkey) and a cell culture supernatant. For example, such tissue extract of cell culture supernatant may be added to a receptor protein of the invention and fractionated while determining a cell stimulating activity and the like, whereby finally obtaining a single ligand.

**[0133]** Typically in a ligand determination method of the invention, a receptor protein or a partial peptide thereof is employed, or a recombinant receptor protein expression system is constructed and used in a receptor binding assay



system, whereby determining a compound (for example, peptide, protein, non-peptide compound, synthetic compound, fermented compound and the like) or a salt thereof having a cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) as being bound to the receptor protein of the invention.

[0134] A ligand determination method of the invention is characterized by a determination of the binding of a test substance to a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof or the cell stimulating activity when bringing such receptor protein of the invention or the partial peptide thereof into contact with such test compound.

[0135] More typically, the present invention provides:

[1] a method for determining a ligand for a receptor protein of the invention or a salt thereof comprising determining the level of the binding of a labeled test compound to the receptor protein of the invention or the salt thereof or a partial peptide of the invention or a salt thereof when bringing such labeled test compound into contact with such protein or the salt thereof or such partial peptide or the salt thereof;

[2] a method for determining a ligand for a receptor protein of the invention or a salt thereof comprising determining the level of the binding of a labeled test compound to a cell containing the receptor protein of the invention or a membrane fraction of such cell when bringing such labeled test compound into contact with such cell or such membrane fraction;

[3] a method for determining a ligand for a receptor protein of the invention comprising determining the level of the binding of a labeled test compound to the receptor protein expressed on a cell membrane by incubating a transformant containing a DNA encoding the receptor protein of the invention when bringing such labeled test compound into contact with such receptor protein or a salt thereof;

[4] a method for determining a ligand for a receptor protein of the invention or a salt thereof comprising determining a receptor protein-mediated cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) when bringing a labeled test compound into contact with a cell containing the receptor protein of the invention; and,

[5] a method for determining a ligand for a receptor protein of the invention or a salt thereof comprising determining a receptor protein-mediated cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) when bringing a labeled test compound into contact with a receptor protein expressed on a cell membrane by incubating a transformant containing a DNA encoding the receptor protein of the invention.

[0136] It is preferred particularly to perform the tests [1] to [3] described above to ensure the binding of a test compound to a receptor protein of the invention prior to performing the tests [4] to [5] described above.

[0137] While a receptor protein employed primarily in a method for determining a ligand may be any of the receptor proteins of the invention or those containing a partial peptide of the invention described above, a receptor protein expressed in a large amount using an animal cell is suitable.

[0138] In order to produce a receptor protein of the invention, an expression method described above may be employed, and it is preferred to express a DNA encoding such receptor protein in a mammalian cell or an insect cell. While a complementary DNA is employed usually as a DNA fragment encoding a target protein moiety, it is not limiting. For example, a gene fragment or a synthetic DNA may also be employed. For the purpose of introducing a DNA fragment encoding a receptor protein of the invention into an animal host cell to effect a highly efficient expression, it is preferred to integrate such DNA fragment into the downstream of a polyhedron promoter of a nuclear polyhedrosis virus (NPV) classified as a baculovirus whose host is an insect, an SV 40-derived promoter, a retrovirus promoter, a metallothioneine promoter, a human heat shock promoter, a cytomegalovirus promoter, an  $\text{SR}\alpha$  promoter and the like. An expressed receptor can be examined for its quantity or quality by a method known per se. For example, a method known in a literature (Nambi, P. et al., J. Biol. Chem., Vol. 267, p.19555 to 19559, 1992) may be employed.

[0139] Accordingly, in a method for determining a ligand of the invention, those containing a receptor protein of the invention or a partial peptide or a salt thereof may be a receptor protein or a partial peptide or a salt thereof which was purified by a method known per se or a cell containing such receptor protein or a cell membrane fraction obtained therefrom.

[0140] When a cell containing a receptor protein of the invention is employed in a method for determining a ligand of the invention, this cell may be immobilized by glutaraldehyde or formalin. Such immobilization can be effected by a

method known per se.

**[0141]** A cell containing a receptor protein of the invention is a host cell expressing the receptor protein of the invention, and such host cell may be an *Escherichia* microorganism, a *Bacillus* microorganism, a yeast, an insect cell, an animal cell and the like.

**[0142]** A cell membrane fraction means a cell membrane-rich fraction obtained by a method known per se after pelletizing the cell. A cell may be pelletized for example by a method in which a cell is pressed and crushed by a Potter-Elvehjem homogenizer, by using a whirling blender or a polytron (Kinematica), by means of an ultrasonic treatment, or by a method in which a cell is sprayed via a fine nozzle while being pressurized by a French press. A cell membrane may be fractionated mainly by a centrifugal fractionation such as a fractional centrifugation or a density gradient centrifugation. For example, a cell pellet is centrifuged at a low speed (500 rpm to 3000 rpm) for a short period (usually about 1 minute to 10 minutes) to obtain a supernatant, which is then centrifuged at a higher speed (15000 rpm to 30000 rpm) usually for 30 minutes to 2 hours to obtain a pellet, which is used as a membrane fraction. This membrane fraction contains a large amount of the membrane components such as an expressed receptor protein and phospholipids and membrane proteins derived from the cell.

**[0143]** The amount of a receptor protein in a cell containing such receptor protein or a membrane fraction thereof is preferably  $10^3$  to  $10^8$  molecules per cell, more preferably  $10^5$  to  $10^7$  molecules. A higher expression leads to a higher ligand binding activity (specific activity) per membrane fraction, whereby allowing not only a highly sensitive screening system to be established but also a large amount of a sample to be determined in an identical lot.

**[0144]** For performing the methods (1) to (3) described above for determining a ligand for a receptor protein of the invention or a salt thereof, a suitable receptor protein fraction and a labeled test compound are required.

**[0145]** A receptor protein fraction is preferably a natural receptor protein fraction or a recombinant receptor fraction having an activity which is equivalent to that of the natural one. The expression "activity which is equivalent" employed here means an equivalent ligand binding activity or signal data transmission activity.

**[0146]** A labeled test compound may for example be [ $^3\text{H}$ ]-, [ $^{125}\text{I}$ ]-, [ $^{14}\text{C}$ ]- or [ $^{35}\text{S}$ ]-labeled angiotensin, bombesin, cannabinoid, cholecystokinin, glutamin, serotonin, melatonin, neuropeptide Y, opioid, purine, vasopressin, oxytocin, PACAP, secretin, glucagon, calcitonin, adrenomedullin, somatostatin, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, VIP (vasoactive intestinal and related polypeptide), somatostatin, dopamine, motilin, amylin, bradykinin, CGRP (calcitonin gene-related peptide), leucotriene, pancreastatin, prostaglandine, thromboxane, adenosine, adrenaline,  $\alpha$  and  $\beta$ -chemokine (for example, IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES and the like), endoserine, enterogastrin, histamine, neurotensin, TRH, pancreatic polypeptide or galanin.

**[0147]** Typically for performing a method for determining a ligand for a receptor protein of the invention or a salt thereof, a cell containing the receptor protein of the invention or a membrane fraction of the cell is suspended in a buffer suitable for the determination method to prepare a receptor standard. Such buffer may for example be a buffer which does not inhibit the binding between a ligand and the receptor protein, such as a phosphate buffer or tris-HCl buffer, pH 4 to 10 (preferably pH 6 to 8). Also for the purpose of reducing the non-specific binding, a surfactant such as CHAPS, Tween-80<sup>TM</sup> (KAO-ATLAS), digitonin, deoxycholate and the like or various proteins such as bovine serum albumin and gelatin may be added to a buffer. In addition, for the purpose of suppressing the cleavage of a receptor or a ligand by a protease, a protease inhibitor such as PMSF, leupeptine, E-64 (PEPTIDE KENKYUSHO) and a pepstatin may also be added. In a 0.01 ml to 10 ml of a solution of the receptor described above, a certain amount (5000 cpm to 500000 cpm) of [ $^3\text{H}$ ]-, [ $^{125}\text{I}$ ]-, [ $^{14}\text{C}$ ]- or [ $^{35}\text{S}$ ]-labeled test substance is contained. For measuring the non-specific binding (NSB) level, a reaction tube containing a large excess of the non-labeled test compound may also be provided. The reaction is performed at a temperature of about 0°C to 50°C, preferably about 4°C to 37°C for a period of about 20 minutes to 24 hours, preferably about 30 minutes to 3 hours. After the reaction, the mixture is filtered through a filter such as a glass fiber filter paper and washed with an appropriate volume of the same buffer and then the radioactivity remaining on the glass fiber filter paper is determined by a liquid scintillation counter or a gamma-counter. A test compound whose count (B-NSB) obtained by subtracting the non-specific binding (NSB) level from the total binding (B) level exceeded 0 cpm can be selected as a ligand (agonist) for the receptor protein of the invention or a salt thereof.

**[0148]** In order to perform the methods [4] to [5] described above for determining a ligand for a receptor protein of the invention or a salt thereof, such receptor protein-mediated cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) can be determined by a known method or using a commercial assay kit. Typically, a cell containing a receptor protein is incubated in a multi-well plate. For determining a ligand, the medium is replaced with a fresh medium or an appropriate buffer which is non-toxic to the cell, and a test compound is added and incubated for a certain period, and then the cell is extracted or the supernatant is recovered and the product accumulated is quantified by a relevant method. When the production of a substance which is an index for a cell stimulating activity (for example, arachidonic acid) is difficult to be assayed due to any degrading enzyme contained in the cell, an inhibitor of such degrading enzyme may be added to perform the assay.



Another activity such as a cAMP production inhibiting activity can be detected as a production inhibiting effect in a cell whose basal production has been increased using forskolin and the like.

**[0149]** A kit of the invention for determining a ligand which binds to a receptor protein of the invention or a salt thereof comprises the receptor protein of the invention or a salt thereof, a partial peptid of the invention or a salt thereof, a cell containing the receptor protein of the invention or a membrane fraction of a cell containing the receptor protein of the invention.

**[0150]** A kit of the invention for determining a ligand may for example be one of those listed below.

#### 1. Ligand determination reagents

##### [1] Assay buffer and washing buffer

**[0151]** Hanks' Balanced Salt Solution (Gibco) supplemented with 0.05 % bovine serum albumin (Sigma).

**[0152]** The buffer is sterilized by filtering through a filter whose pore size is 0.45  $\mu\text{m}$  and stored at 4°C or prepared just before use.

##### [2] G-protein coupled receptor protein standard

**[0153]** A CHO cell expressing a receptor protein of the invention is subjected to a subculture in a 12-well plate at the density of  $5 \times 10^5$  cells/well and incubated at 37° C under 5% CO<sub>2</sub> and 95 % air for 2 days.

##### [3] Labeled test compound

**[0154]** A commercially available [<sup>3</sup>H]-, [<sup>125</sup>I]-, [<sup>14</sup>C]- or [<sup>35</sup>S]-labeled compound or an appropriately labeled compound.

**[0155]** A compound in an aqueous solution is stored at 4° C or -20°C and diluted at 1  $\mu\text{M}$  with an assay buffer just before use. A water-insoluble test compound is dissolved in dimethylformamide, DMSO, methanol and the like.

##### [4] Non-labeled test compound

**[0156]** The compound identical to the labeled compound is prepared at a concentration higher by 100 to 1000 times.

#### 2. Assay

##### [0157]

[1] An inventive receptor protein-expressing CHO cell which has been incubated in a 12-well tissue culture plate is washed twice with 1 ml of an assay buffer and each 490  $\mu\text{l}$  of the assay buffer is added to each well.

[2] 5  $\mu\text{l}$  of a labeled test compound was added and allowed to react at room temperature for 1 hour. 5  $\mu\text{l}$  of a non-labeled test compound is also added for measuring the non-specific binding.

[3] The reaction mixture is removed and the cell is washed three times with 1 ml of the washing buffer. The labeled test compound bound to the cell is dissolved by 0.2 N NaOH-1% SDS, and mixed with 4 ml of a liquid scintillator A (Wako Pure Chemical).

[4] Using a liquid scintillation counter (Beckman), the radioactivity is determined.

**[0158]** A ligand capable of being bound to a receptor protein of the invention or a salt thereof may for example be a substance existing specifically in brain, pituitary and pancreas, such as angiotensin, bombesin, cannabinoid, cholecystokinin, glutamin, serotonin, melatonin, neuropeptide Y, opioid, purine, vasopressin, oxytocin, PACAP, secretin, glucagon, calcitonin, adrenomedulin, somatostatin, GHRH, CRF, ACTH, GRP, PTH, VIP (vasoactive intestinal and related polypeptide), somatostatin, dopamine, motilin, amylin, bradykinin, CGRP (calcitonin gene-related peptide), leucotriene, pancreastatin, prostaglandine, thromboxane, adenosine, adrenaline,  $\alpha$  and  $\beta$ -chemokine (for example, IL-8, GRO $\alpha$ , GRO $\beta$ , GRO $\gamma$ , NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES and the like), endoserine, enterogastrin, histamine, neurotensin, TRH, pancreatic polypeptide, galanin and the like.

(2) Preventing and/or treating agent against disease related to dysfunction of G-protein coupled receptor protein of the invention

**[0159]** Once a ligand for a receptor protein of the invention has been characterized in the method (1) described above, it becomes possible to use [1] the receptor protein of the invention or [2] a DNA encoding this receptor protein as a pharmaceutical for preventing and/or treating a disease related to the dysfunction of the receptor protein of the invention in accordance with a function which the ligand has.

**[0160]** For example, in a patient whose ligand is not allowed to exert a physiological effect due to an in vivo reduction in a receptor protein of the invention (a patient having a deficiency of the receptor protein), the in vivo receptor protein in this patient can be increased to allow the ligand to exert the effect sufficiently by [1] administering the receptor protein of the invention to the patient to supplement the receptor protein, or by [2] (a) administering a DNA encoding the receptor protein of the invention to the patient to effect an expression of the protein or (b) inserting a DNA encoding the receptor protein of the invention into a target cell where the protein is expressed followed by implanting the cell into the patient. Thus, a DNA encoding a receptor protein of the invention is useful as a safe pharmaceutical low in toxicity for preventing and/or treating a disease related to the dysfunction of the receptor protein of the invention.

**[0161]** A receptor protein of the invention has a homology of about 30%, at the level of the amino acid sequence, with MAS which is one of G-protein coupled receptor proteins. Since it was reported that a change in the central nervous functions such as an increased anxiety was observed in an MAS gene defect mouse [J.B.C., 273 (No.19), 11867-11873 (1998)], the MAS gene is considered to play some role in the expression of the central nervous functions. Accordingly, a receptor protein of the invention having a homology with the MAS is useful in preventing and/or treating a disease related to an insufficiency of the central nervous functions (psychosis such as anxiety, schizophrenia, manic-depressive, dementia, retardation and dyskinesia). Also since it was reported that the expression of a rat MAS gene was increased in various peripheral organs just after delivery and then such high expression was still observed in the testis in addition to the central nervous system once after being matured [FEBS Lett. 357:27-32 (1995)], an important role in the cell growth, the acquisition of functions and the reproduction is also suggested. Accordingly, a receptor protein of the invention having a homology with the MAS is useful in preventing and/or treating respiratory, circulatory, digestive, hepatic/biliary/pancreatic and endocrinal diseases.

**[0162]** When a receptor protein of the invention is used as a preventing and/or treating agent as discussed above, a standard method can be employed to obtain a dosage form.

**[0163]** On the other hand, when a DNA encoding a receptor protein of the invention (hereinafter sometimes abbreviated as a DNA of the invention) is used as a preventing and/or treating agent described above, the DNA of the invention can be administered directly as it is or after an insertion into a suitable vector such as a retrovirus vector, an adenovirus vector, an adenovirus-associated virus vector and the like by a standard method. A DNA of the invention can be administered, as it is or in a formulation together with an auxiliary agent for promoting ingestion, using a gene gun or a catheter such as a hydrogel catheter.

**[0164]** For example, [1] a receptor protein of the invention or [2] a DNA encoding such receptor protein may be given orally as an optionally sugar-coated tablet, capsule, elixir, microcapsule and the like, or parenterally as a formulation for injection such as an aseptic solution or suspension in water or a pharmacologically acceptable liquid. For example, such formulation can be produced by mixing [1] a receptor protein of the invention or [2] a DNA encoding such receptor protein with a known physiologically acceptable carrier, flavor, excipient, vehicle, preservative stabilizer, binder and the like in a unit dosage form which is acceptable generally in pharmaceutical practice. The amount of an active ingredient in such formulation should be adjusted to achieve a suitable dose within a specified range.

**[0165]** An additive which may be incorporated into a tablet or a capsule may for example be a binder such as gelatin, corn starch, tragacanth, gum arabic and the like, an excipient such as crystalline cellulose, an expander such as corn starch, gelatin, alginic acid and the like; a lubricant such as magnesium stearate, a sweetener such as sucrose, lactose or saccharin, a flavor such as peppermint, oil of Geultheria ovatifolia spp., cherry and the like. When a unit dosage form is a capsule, a liquid carrier such as a fat may further be incorporated in addition to the materials described above. An aseptic formulation for injection can be prepared in accordance with ordinary pharmaceutical practice such as a dissolution or a suspension of an active ingredient, a naturally-occurring vegetable oil such as sesame oil and palm oil in a vehicle such as water for injection. An aqueous liquid for injection may for example be physiological saline, an isotonic solution containing glucose or other auxiliary agents (for example, D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride) and the like, which may be used in combination with a suitable solubilizer such as an alcohol (for example, ethanol), a polyalcohol (for example, propylene glycol, polyethylene glycol), a non-ionic surfactant (for example, polysorbate 80™, HCO-50). An oily liquid may for example be sesame oil and soybean oil, which may be used in combination with a solubilizer such as benzyl benzoate, benzyl alcohol and the like.

**[0166]** In addition, a preventing and/or treating agent described above may be supplemented also with a buffer agent (for example, phosphate buffer, sodium acetate buffer), a pain-ameliorating agent (for example, benzalkonium chloride, procaine hydrochloride), a stabilizer (for example, human serum albumin, polyethylene glycol), a preservative (for example, benzyl alcohol, phenol), an antioxidant. A formulation for injection thus prepared is then filled usually in a suitable ampoule.

**[0167]** Since a formulation thus obtained is safe and low in toxicity, it can be administered to a human or a mammalian animal (for example, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like).

**[0168]** While a receptor protein of the invention may be given at a dose which varies depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, it can be given orally to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20

mg. When it is given parenterally, the single dose may vary depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, and may for example be given as a formulation for injection to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 to 20 mg, more preferably about 0.1 to 10 mg, which is given advantageously by an intravenous injection. Also in other animals, a dose calculated for a 60 kg body weight may be administered.

[0169] While a DNA of the invention may be given at a dose which varies depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, it can be given orally to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg. When it is given parenterally, the single dose may vary depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, and may for example be given as a formulation for injection to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 to 20 mg, more preferably about 0.1 to 10 mg, which is given advantageously by an intravenous injection. Also in other animals, a dose calculated for a 60 kg body weight may be administered..

### (3) Gene diagnostic agent

[0170] Since a DNA of the invention, when used as a probe, can detect an abnormality (gene abnormality) in a DNA or an mRNA encoding a receptor protein or its partial peptide of the invention in a human or a mammalian animal (for example, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like), it is useful in a gene diagnosis of an impairment, a mutation or a reduced expression of such DNA or mRNA as well as an increase in or an increased expression of such DNA or mRNA.

[0171] A gene diagnosis employing a DNA of the invention can be performed for example by a northern hybridization known per se or a PCR-SSCP method (Genomics, Vol.5, p874-879 (1989)) or a method described in Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, Vol.86, p2766-2770 (1989).

### (4) Method for screening compound capable of altering expression level of receptor protein of the invention or a partial peptide thereof

[0172] A DNA of the invention, when used as a probe, can be applied to a screening for a compound which alters the expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof.

[0173] Thus, the invention provides a method for screening for a compound which alters the expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof, for example, by determining the level of an mRNA of the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof contained in (i) [1] blood, [2] a certain organ and [3] a tissue or a cell isolated from an organ of a non-human mammal or in (ii) a transformant.

[0174] Typically, the level of an mRNA of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof is determined as follows.

(i) A normal or a disease-bearing non-human mammalian model animal (for example, mouse, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like, more specifically, dementia rat, obesity mouse, arteriosclerosis rabbit, bile cancer mouse and the like) is treated with an agent (for example, anti-dementia agent, hypotensive agent, anti-cancer agent, anti-obesity agent and the like) or subjected to a mechanical stress (for example, flooding stress, electric shock, dark/light cycle, low temperature and the like), and after a certain time period, blood, a certain organ (for example, brain, liver, kidney and the like) or a tissue isolated from an organ or a cell is collected.

The mRNA contained in a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof contained in a cell collected as described above can be quantified by extracting the mRNA from the cell by a standard method followed for example by TacManPCR, or can be analyzed by a northern blotting using a means known per se.

(ii) A transformant which expresses a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof is prepared according to the method described above and a mRNA of the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof contained in this transformant can be quantified and similarly analyzed.

A screening for a compound altering the expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof can be accomplished by:

(i) administering to a normal or disease-bearing non-human mammalian model animal a test compound at a certain time point before (30 minutes to 24 hours, preferably 30 minutes to 12 hours, more preferably 1 hour to 6 hours before) or after (30 minutes to 3 days, preferably 1 hour to 2 days, more preferably 1 hour to 24 hours after) the exposure to a medication or a mechanical stress, or simultaneously with a medication or a mechanical stress, followed by quantifying and analyzing a mRNA of the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof contained in a cell at a certain time point after (30 minutes to 3 days, preferably 1

hour to 2 days, more preferably 1 hour to 24 hours after) the administration;  
 (ii) adding a test compound to a culture medium in which a transformant is incubated by a standard method followed by quantifying and analyzing a mRNA of the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof contained in the transformant at a certain time point after (1 day to 7 days, preferably 1 day to 3 days, more preferably 2 days to 3 days after) initiation of the incubation.

A compound or a salt thereof obtained by a screening method of the invention is a compound having an ability of altering the expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof, and typically it is (a) a compound which enhances a G-protein coupled receptor protein-mediated cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) by increasing the expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof, and (b) a compound which suppresses such cell stimulating activity by reducing the expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof.

[0175] Such compound may for example be a peptide, a protein, a non-peptide compound, a synthetic compound, a fermented compound and the like, which may be novel compounds or known compounds.

[0176] A compound enhancing such cell stimulating activity is useful as a safe and pharmaceutical low in toxicity for enhancing a physiological activity of a receptor protein of the invention.

[0177] A compound suppressing such cell stimulating activity is useful as a safe and pharmaceutical low in toxicity for reducing the physiological activity of a receptor protein of the invention.

[0178] When a compound or a salt thereof obtained by a screening method of the invention is used in a pharmaceutical composition, a standard procedure may be followed. For example, similarly to a pharmaceutical containing a receptor protein of the invention, a dosage form such as tablet, capsule, elixir, microcapsule, aseptic solution or suspension can be formulated.

[0179] Since a formulation thus obtained is safe and low in toxicity, it can be administered to a human or a mammalian animal (for example, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like).

[0180] While such compound may be given at a dose which varies depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, it can be given orally to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg. When it is given parenterally, the single dose may vary depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, and may for example be given as a formulation for injection to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 to 20 mg, more preferably about 0.1 to 10 mg, which is given advantageously by an intravenous injection. Also in other animals, a dose calculated for a 60 kg body weight may be administered.

(5) Preventing and/or treating agent against various diseases containing compound capable of altering expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof

[0181] As described above, a receptor protein of the invention is considered to play some important in vivo role for example in central nervous function. Accordingly, a compound altering the expression level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof can be used as a preventing and/or treating agent against a disease related to the dysfunction of the receptor protein of the invention.

[0182] When such compound is used as a preventing and/or treating agent against a disease related to the dysfunction of a receptor protein of the invention, a standard formulation procedure may be followed.

[0183] For example, such compound may be given orally as an optionally sugar-coated tablet, capsule, elixir, microcapsule and the like, or parenterally as a formulation for injection such as an aseptic solution or suspension in water or pharmacologically acceptable liquid. For example, such formulation can be produced by mixing the compound with a known physiologically acceptable carrier, flavor, excipient, vehicle, preservative, stabilizer, binder and the like in a unit dosage form which is acceptable generally in pharmaceutical practice. The amount of an active ingredient in such formulation should be adjusted to achieve a suitable dose within a specified range.

[0184] An additive which may be incorporated into a tablet or a capsule may for example be a binder such as gelatin, corn starch, tragacanth, gum arabic and the like, an excipient such as crystalline cellulose, an expander such as corn starch, gelatin, alginic acid and the like, a lubricant such as magnesium stearate, a sweetener such as sucrose, lactose or saccharin, a flavor such as peppermint, oil of Geultheria ovatifolia spp., cherry and the like. When a unit dosage form is a capsule, a liquid carrier such as a fat may further be incorporated in addition to the materials described above. An aseptic formulation for injection can be prepared in accordance with ordinary pharmaceutical practice such as a

dissolution or a suspension of an active ingredient, a naturally-occurring vegetable oil such as sesame oil and palm oil in a vehicle such as water for injection. An aqueous liquid for injection may for example be physiological saline, an isotonic solution containing glucose or other auxiliary agents (for example, D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride) and the like, which may be used in combination with a suitable solubilizer such as an alcohol (for example, ethanol), a polyalcohol (for example, propylene glycol, polyethylene glycol), a non-ionic surfactant (for example, polysorbate 80™, HCO-50). An oily liquid may for example be sesame oil and soybean oil, which may be used in combination with a solubilizer such as benzyl benzoate, benzyl alcohol and the like.

**[0185]** In addition, a preventing and/or treating agent described above may be supplemented also with a buffer agent (for example, phosphate buffer, sodium acetate buffer), a pain-ameliorating agent (for example, benzalkonium chloride, procaine hydrochloride), a stabilizer (for example, human serum albumin, polyethylene glycol), a preservative (for example, benzyl alcohol, phenol), an antioxidant. A formulation for injection thus prepared is then filled usually in a suitable ampoule.

**[0186]** Since a formulation thus obtained is safe and low in toxicity, it can be administered to a human or a mammalian animal (for example, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like).

**[0187]** While such compound or a salt thereof may be given at a dose which varies depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, it can be given orally to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg. When it is given parenterally, the single dose may vary depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, and may for example be given as a formulation for injection to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 to 20 mg, more preferably about 0.1 to 10 mg, which is given advantageously by an intravenous injection. Also in other animals, a dose calculated for a 60 kg body weight may be administered.

#### (6) Method for quantifying ligand for G-protein coupled receptor protein of the invention

**[0188]** Since a receptor protein of the invention has a binding affinity to a ligand, it can quantify an in vivo ligand concentration at a high sensitivity.

**[0189]** A quantification method of the invention can be employed for example in combination with a competitive method. Thus, a sample is brought into contact with a receptor of the invention and the like to determine the concentration of a ligand in the sample. Typically, a method described in literatures [1] and [2] shown below or an analogous method may be employed.

[1] Ed. by H. Irie, "Radioimmunoassay", (KODANSHA, 1974)

[2] Ed. by H. Irie, "Radioimmunoassay, 2nd Vol.", (KODANSHA, 1979)

#### (7) Method for screening a compound (agonist, antagonist) capable of altering binding affinity between G-protein coupled receptor protein of the invention and ligand

**[0190]** By using a receptor protein and the like of the invention, or by constructing an expression system of a recombinant receptor protein followed by employing a receptor binding assay system employing this expression system, a compound altering the binding affinity between a ligand and the receptor protein of the invention and the like (for example, peptide, protein, non-peptide compound, synthetic compound, fermented compound and the like) a salt thereof can efficiently be screened for.

**[0191]** Such compound includes (a) a compound having a G-protein coupled receptor-mediated cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) (so-called agonist for a receptor protein of the invention), (b) a compound having no such cell stimulating activity (so-called antagonist for a receptor protein of the invention), (c) a compound enhancing the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein of the invention, or (d) a compound reducing the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein of the invention (it is preferred to screen for a compound defined as (a) by a ligand determination method described above).

**[0192]** Thus, the invention provides a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a receptor protein of the invention or a partial peptide or a salt thereof comprising a comparison between (i) a contact of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof or a salt thereof with the ligand and (ii) a contact of the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof or a salt thereof with the ligand and a test compound.

**[0193]** A screening method of the invention is characterized by a determination of and a comparison between the

levels of the binding of a ligand to such receptor protein and the cell stimulating activities upon a case (i) and upon a case (ii).

[0194] More typically, the invention provides:

- 5 [1] a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a receptor protein and the like of the invention comprising a determination of and a comparison between the levels of the binding of a labeled ligand to the receptor protein of the invention and the like upon a contact of the labeled ligand with the receptor protein of the invention and the like and upon a contact of the labeled ligand and a test compound with the receptor protein of the invention and the like;
- 10 [2] a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a receptor protein and the like of the invention comprising a determination of and a comparison between the levels of the binding of a labeled ligand to a cell or a membrane fraction thereof comprising the receptor protein of the invention and the like upon a contact of the labeled ligand with said cell or the membrane fraction thereof and upon a contact of the labeled ligand and a test substance with said cell or the membrane fraction thereof;
- 15 [3] a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a receptor protein and the like of the invention comprising a determination of and a comparison between the levels of the binding of a labeled ligand to the receptor protein and the like expressed on the cell membrane by incubating a transformant containing a DNA of the invention upon a contact of the labeled ligand with such receptor protein and the like and upon a contact of the labeled ligand and a test substance with such receptor protein;
- 20 [4] a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a receptor protein and the like of the invention comprising a determination of and a comparison between a receptor-mediated cell stimulating activities (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) upon a contact of a compound activating the receptor protein and the like (for example, a ligand for the receptor protein of the invention) with a cell comprising the receptor protein and the like and upon a contact of a compound activating the receptor protein and the like and a test compound with the cell comprising the receptor protein and the like; and,
- 30 [5] a method for screening a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a receptor protein and the like of the invention comprising a determination of and a comparison between a receptor-mediated cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) upon a contact of a compound activating the receptor protein and the like (for example, a ligand for the receptor protein of the invention) with the receptor protein and the like expressed on the cell membrane by incubating a transformant containing a DNA of the invention and upon a contact of the compound activating the receptor protein and the like and a test compound with the receptor protein and the like expressed on the cell membrane by incubating a transformant containing a DNA of the invention.

40 [0195] In the days when a receptor protein and the like of the invention was not available, screening for a G-protein coupled receptor agonist or antagonist involved the use of a G-protein coupled receptor protein-containing cell, tissue or cell membrane fraction, for example, of a rat to obtain a candidate compound (primary screening) followed by a test for verifying that the candidate compound surely inhibits the binding between a human G-protein coupled receptor protein and a ligand (secondary screening). Since other receptor proteins were allowed to be present simultaneously when such cell, tissue or cell membrane was used as it is, it was difficult practically to screen for an agonist or antagonist for an intended receptor protein.

45 [0196] On the contrary, the use of a human-derived receptor protein obtained according to the invention requires no such primary screening and allows a compound which inhibits the binding between a ligand and a G-protein coupled receptor protein to be selected for at a high efficiency. In addition, a convenient judgement whether a selected compound is an agonist or an antagonist becomes possible.

50 [0197] A typical screening method of the invention is described below.

[0198] A receptor protein and the like of the invention employed in a screening method of the invention may be any one containing a receptor protein of the invention and the like described above, and is preferably a cell membrane fraction of an organ of a mammalian animal containing the receptor protein of the invention and the like. Nevertheless, a screening may employ a human-derived receptor protein which is expressed in a large amount using a recombinant since an organ derived especially from a human is extremely difficult to obtain.

55 [0199] In order to produce a receptor protein of the invention, an expression method described above may be employed, and it is preferred to express a DNA of the invention in a mammalian cell or an insect cell. While a complementary

DNA is employed as a DNA fragment encoding a target protein-moiety, it is not limiting. For example, a gene fragment or a synthetic DNA may also be employed. For the purpose of introducing a DNA fragment encoding a receptor protein of the invention into an animal host cell to effect a highly efficient expression, it is preferred to integrate such DNA fragment downstream of a polyhedron promoter of a nuclear polyhedrosis virus (NPV) classified as a baculovirus whose host is an insect, an SV 40-derived promoter, a retrovirus promoter, a metallothioneine promoter, a human heat shock promoter, a cytomegalovirus promoter, an SR $\alpha$  promoter and the like. An expressed receptor can be examined for its quantity or quality by a method known per se. For example, a method known in the literature (Nambi, P. et al., J.Biol. Chem., Vol. 267, p. 19555 to 19559, 1992) may be employed.

[0200] Accordingly, in a screening method of the invention, those containing a receptor protein and the like of the invention may be a receptor protein and the like which was purified by a method known per se or a cell containing such receptor protein or a cell membrane fraction containing such receptor protein.

[0201] When a cell containing a receptor protein of the invention is employed in a screening method of the invention, this cell may be immobilized by glutaraldehyde or formalin. Such immobilization can be effected by a method known per se.

[0202] A cell containing a receptor protein of the invention is a host cell expressing the receptor protein of the invention, and such host cell may preferably be an Escherichia microorganism, a Bacillus microorganism, a yeast, an insect cell, an animal cell and the like.

[0203] A cell membrane fraction means a cell membrane-rich fraction obtained by a method known per se after pelletizing the cell. A cell may be pelletized for example by a method in which a cell is pressed and crushed by a Potter-Elvehjem homogenizer, by using a whirling blender or a polytron (Kinematica), by means of an ultrasonic treatment, or by a method in which a cell is sprayed via a fine nozzle while being pressurized by a French press. A cell membrane may be fractionated mainly by a centrifugal fractionation such as a fractional centrifugation or a density gradient centrifugation. For example, a cell pellet is centrifuged at a low speed (500 rpm to 3000 rpm) for a short period (usually about 1 minutes to 10 minutes) to obtain a supernatant, which is then centrifuged at a higher speed (15000 rpm to 30000 rpm) usually for 30 minutes to 2 hours to obtain a pellet, which is used as a membrane fraction. This membrane fraction contains a large amount of the membrane components such as an expressed receptor protein and phospholipids and membrane proteins derived from the cell.

[0204] The amount of a receptor protein in a cell containing such receptor protein or a membrane fraction thereof is preferably  $10^3$  to  $10^8$  molecules per cell, more preferably  $10^5$  to  $10^7$  molecules. A higher expression leads to a higher ligand binding activity (specific activity) per membrane fraction, whereby allowing not only a highly sensitive screening system to be established but also a large amount of a sample to be determined in an identical lot.

[0205] For performing the methods (1) to (3) described above for screening for a compound altering the binding affinity between a ligand and a receptor protein and the like of the invention, a suitable receptor protein fraction and a labeled test compound are required.

[0206] A receptor protein fraction is preferably a natural receptor protein fraction or a recombinant receptor protein fraction having an activity which is equivalent to that of the natural one. The expression "activity which is equivalent" employed here means an equivalent ligand binding activity or signal data transmission activity.

[0207] A labeled ligand may be a labeled ligand and a labeled ligand analogue compound. For example, a ligand labeled with [ $^3\text{H}$ ], [ $^{125}\text{I}$ ], [ $^{14}\text{C}$ ] or [ $^{35}\text{S}$ ] may be employed.

[0208] Typically for performing a method for screening for a compound altering the binding affinity between a ligand and a receptor protein and the like of the invention, a cell containing the receptor protein of the invention or a membrane fraction of the cell is suspended in a buffer suitable for the screening to prepare a receptor protein standard. Such buffer may for example be a buffer which does not inhibit the binding between a ligand and the receptor protein, such as a phosphate buffer or tris-HCl buffer, pH 4 to 10 (preferably pH 6 to 8). Also for the purpose of reducing the non-specific binding, a surfactant such as CHAPS, Tween-80<sup>TM</sup> (KAO-ATLAS), digitonin, deoxycholate and the like may be added to a buffer. In addition, for the purpose of suppressing the cleavage of a receptor or a ligand by a protease, a protease inhibitor such as PMSF, leupeptine, E-64 (PEPTIDE KENKYUSHO) and a pepstatin may also be added. In a 0.01 ml to 10 ml of a solution of the receptor described above, a certain amount (5000 cpm to 500000 cpm) of a labeled ligand is added and a test compound is allowed to be present simultaneously at a concentration of  $10^{-4}\text{M}$  to  $10^{-10}\text{M}$ . For measuring the non-specific binding (NSB) level, a reaction tube containing a large excess of the non-labeled ligand may also be provided. The reaction is performed at a temperature of about  $0^\circ\text{C}$  to  $50^\circ\text{C}$ , preferably about  $4^\circ\text{C}$  to  $37^\circ\text{C}$  for a period of about 20 minutes to 24 hours, preferably about 30 minutes to 3 hours. After the reaction, the mixture is filtered through a filter such as a glass fiber filter paper and washed with an appropriate volume of the same buffer and then the radioactivity remaining on the glass fiber filter paper is determined by a liquid scintillation counter or a gamma-counter. By regarding the count ( $B_0$ -NSB) obtained by subtracting the non-specific binding (NSB) level from the binding ( $B_0$ ) in the absence of any competitive substance as 100 %, a test compound whose specific binding ( $B$ -NSB) is 50 % or less can be selected as a candidate having a competitive inhibitory effect.

[0209] In order to perform the methods [4] to [5] described above for screening for a compound altering the binding



affinity between a ligand and a receptor protein and the like of the invention, such receptor protein-mediated cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) can be determined by a known method or using a commercial assay kit.

[0210] Typically, a cell containing a receptor protein and the like of the invention is incubated in a multi-well plate. For a screening, the medium is replaced with a fresh medium or an appropriate buffer which is non-toxic to the cell, and a test compound is added and incubated for a certain period, and then the cell is extracted or the supernatant is recovered and the product accumulated is quantified by a relevant method. When the production of a substance which is an index for a cell stimulating activity (for example, arachidonic acid) is difficult to be assayed due to any degrading enzyme contained in the cell, an inhibitor of such degrading enzyme may be added to perform the assay. Another activity such as a cAMP production inhibiting activity can be detected as a production inhibiting effect in a cell whose basal production has been increased using forskolin and the like.

[0211] To perform a screening with determining a cell stimulating activity, a suitable cell expressing a receptor protein is required. A cell expressing a receptor protein and the like of the invention is preferably a cell line having a natural receptor protein and the like of the invention and a cell line expressing a recombinant receptor protein and the like described above.

[0212] A test compound may be a peptide, a protein, a non-peptide compound, a synthetic compound, a fermented compound, a cell extract, a plant extract, an animal tissue extract and the like, which may be a novel compound or a known compound.

[0213] A kit of the invention for screening a compound or a salt thereof altering the binding affinity between a ligand and a receptor protein and the like of the invention comprises the receptor protein and the like of the invention, a cell containing the receptor protein and the like of the invention or a membrane fraction of a cell containing the receptor protein and the like of the invention.

[0214] A screening kit of the invention may for example be one of those listed below.

#### 1. Screening reagents

##### [1] Assay buffer and washing buffer

[0215] Hanks' Balanced Salt Solution (Gibco) supplemented with 0.05 % bovine serum albumin (Sigma).

[0216] The buffer is sterilized by filtering through a filter whose pore size is 0.45  $\mu\text{m}$  and stored at 4°C or prepared just before use.

##### [2] G-protein coupled receptor standard

[0217] A CHO cell expressing a receptor protein of the invention is subjected to a subculture in a 12-well plate at the density of  $5 \times 10^5$  cells/well and incubated at 37° C under 5%  $\text{CO}_2$  and 95 % air for 2 days.

##### [3] Labeled test compound

[0218] A commercially available [ $^3\text{H}$ ]-, [ $^{125}\text{I}$ ]-, [ $^{14}\text{C}$ ]- or [ $^{35}\text{S}$ ]-labeled ligand.

[0219] A ligand in an aqueous solution is stored at 4°C or -20°C and diluted at 1  $\mu\text{M}$  with an assay buffer just before use.

##### [4] Ligand standard solution

[0220] A ligand is dissolved at 1 mM with a PBS supplemented with 0.1 % bovine serum albumin (Sigma) and stored at -20° C.

#### 2. Assay

##### [0221]

[1] An inventive receptor protein-expressing CHO cell which has been incubated in a 12-well tissue culture plate is washed twice with 1 ml of an assay buffer and each 490  $\mu\text{l}$  of the assay buffer is added to each well.

[2] After adding 5  $\mu\text{l}$  of a  $10^{-3}$  to  $10^{-10}$  M solution of a test compound, 5  $\mu\text{l}$  of a labeled ligand is added and allowed to react at room temperature for 1 hour. 5  $\mu\text{l}$  of a  $10^{-3}$  M ligand is added instead of the test compound for measuring



the non-specific binding.

[3] The reaction mixture is removed and the cell is washed three times with 1 ml of the washing buffer. The labeled ligand bound to the cell is dissolved by 0.2 N NaOH-1% SDS, and mixed with 4 ml of a liquid scintillator A (Wako Pure Chemical).

[4] Using a liquid scintillation counter (Beckman), the radioactivity is determined, and a percent maximum binding (PMB) is calculated as follows.

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

wherein PMB is a percent maximum binding, B is a binding level in the presence of a sample, NSB is a non-specific binding level and  $B_0$  is the maximum binding level.

[0222] A compound or a salt obtained by a screening method or using a screening kit of the invention is a compound having an ability of altering the binding affinity between a ligand and a receptor protein and the like of the invention, and typically it is (a) a compound having a G-protein coupled receptor-mediated cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) (so-called agonist for a receptor protein of the invention), (b) a compound having no such cell stimulating activity (so-called antagonist for a receptor protein of the invention), (c) a compound enhancing the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein of the invention, or (d) a compound reducing the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein of the invention.

[0223] Such compound may for example be a peptide, a protein, a non-peptide compound, a synthetic compound, a fermented compound and the like, which may be novel compounds or known compounds.

[0224] Since an agonist for a receptor protein and the like of the invention has a physiological effect similar to that possessed by a ligand for the receptor protein and the like of the invention, it is useful as a safe and pharmaceutical low in toxicity utilizing the relevant ligand activity.

[0225] Since an antagonist for a receptor protein and the like of the invention has an inhibitory effect on the physiological effect of a ligand for the receptor protein and the like of the invention, it is useful as a safe and pharmaceutical low in toxicity inhibiting the ligand activity.

[0226] A compound enhancing the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein of the invention is useful as a safe and pharmaceutical low in toxicity for enhancing the bioactivity of a ligand for the receptor protein and the like of the invention.

[0227] A compound reducing the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein of the invention is useful as a safe and pharmaceutical low in toxicity for reducing the bioactivity of a ligand for the receptor protein and the like of the invention.

[0228] When a compound or a salt thereof obtained by a screening method or using a screening kit of the invention is used in a pharmaceutical composition, a standard procedure may be followed. For example, similarly to a pharmaceutical containing a receptor protein of the invention, a dosage form such as tablet, capsule, elixir, microcapsule, aseptic solution or suspension can be formulated.

[0229] Since a formulation thus obtained is safe and low in toxicity, it can be administered to a human or a mammalian animal (for example, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like).

[0230] While such compound may be given at a dose which varies depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, it can be given orally to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg. When it is given parenterally, the single dose may vary depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, and may for example be given as a formulation for injection to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 to 20 mg, more preferably about 0.1 to 10 mg, which is given advantageously by an intravenous injection. Also in other animals, a dose calculated for a 60 kg body weight may be administered.

(8) Preventing and/or treating agent against various disease containing compounds (agonist, antagonist) capable of altering the binding affinity between G-protein coupled receptor protein of the invention and ligand

[0231] As described above, a receptor protein of the invention is considered to play some important in vivo role for example in central nervous function. Accordingly, a compound (agonist, antagonist) capable of altering the binding affinity between a receptor protein of the invention and a ligand can be used as a preventing and/or treating agent

against a disease related to the dysfunction of the receptor protein of the invention.

**[0232]** When such compound is used as a preventing and/or treating agent against a disease related to the dysfunction of a receptor protein of the invention, a standard procedure may be followed.

**[0233]** For example, such compound may be given orally as an optionally sugar-coated tablet, capsule, elixir, microcapsule and the like, or parenterally as a formulation: for injection such as an aseptic solution or suspension in water or pharmacologically acceptable liquid. For example, such formulation can be produced by mixing the compound with a known physiologically acceptable carrier, flavor, excipient, vehicle, preservative, stabilizer, binder and the like in a unit dosage form which is acceptable generally in pharmaceutical practice. The amount of an active ingredient in such formulation should be adjusted to achieve a suitable dose within a specified range.

**[0234]** An additive which may be incorporated into a tablet or a capsule may for example be a binder such as gelatin, corn starch, tragacanth, gum arabic and the like, an excipient such as crystalline cellulose, an expander such as corn starch, gelatin, alginic acid and the like, a lubricant such as magnesium stearate, a sweetener such as sucrose, lactose or saccharin, a flavor such as peppermint, oil of Geultheria ovatifolia spp., cherry and the like. When a unit dosage form is a capsule, a liquid carrier such as a fat may further be incorporated in addition to the materials described above.

An aseptic formulation for injection can be prepared in accordance with ordinary pharmaceutical practice such as a dissolution or a suspension of an active ingredient, a naturally-occurring vegetable oil such as sesame oil and palm oil in a vehicle such as water for injection. An aqueous liquid for injection may for example be physiological saline, an isotonic solution containing glucose or other auxiliary agents (for example, D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride) and the like, which may be used in combination with a suitable solubilizer such as an alcohol (for example, ethanol), a polyalcohol (for example, propylene glycol, polyethylene glycol), a non-ionic surfactant (for example, polysorbate 80™, HCO-50). An oily liquid may for example be sesame oil and soybean oil, which may be used in combination with a solubilizer such as benzyl benzoate, benzyl alcohol and the like.

**[0235]** In addition, a preventing and/or treating agent described above may be supplemented also with a buffer agent (for example, phosphate buffer, sodium acetate buffer), a pain-ameliorating agent (for example, benzalkonium chloride, procaine hydrochloride), a stabilizer (for example, human serum albumin, polyethylene glycol), a preservative (for example, benzyl alcohol, phenol), an antioxidant. A formulation for injection thus prepared is then filled usually in a suitable ampoule.

**[0236]** Since a formulation thus obtained is safe and low in toxicity, it can be administered to a human or a mammalian animal (for example, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like).

**[0237]** While such compound or a salt thereof may be given at a dose which varies depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, it can be given orally to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg. When it is given parenterally, the single dose may vary depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, and may for example be given as a formulation for injection to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 to 20 mg, more preferably about 0.1 to 10 mg, which is given advantageously by an intravenous injection. Also in other animals, a dose calculated for a 60 kg body weight may be administered.

#### (9) Quantification of receptor protein of the invention or partial peptide thereof or salt thereof

**[0238]** Since an antibody of the invention can recognize the receptor protein and the like of the invention specifically, it can be used for quantifying the receptor protein and the like of the invention in a test sample, especially by a sandwich immunoassay. Thus, the present invention also provides, for example, (i) a method for quantifying a receptor protein and the like of the invention in a test sample comprising a competitive reaction of an antibody of the invention with the test sample and a labeled receptor protein and the like of the invention followed by a determination of the ratio of the labeled receptor protein and the like of the invention bound to the antibody, and (ii) a method for quantifying a receptor protein and the like of the invention in a test sample comprising a simultaneous or sequential reaction of the test sample with an antibody of the invention insolubilized on a carrier and another labeled antibody of the invention followed by a determination of the activity of the label on the insolubilized carrier.

**[0239]** In the method of (ii) described above, it is preferred that one antibody is an antibody recognizing the N-terminal of a receptor protein and the like of the invention and the other is reactive with the C-terminal of the receptor protein of the invention.

**[0240]** Using a monoclonal antibody against a receptor protein and the like of the invention (hereinafter sometimes referred to as a monoclonal antibody of the invention), the receptor protein and the like of the invention can be quantified and detection by a tissue staining and the like can also be performed. For these purposes, an antibody molecule itself may be used, or a F(ab')<sub>2</sub>, Fab' or Fab fraction of the antibody molecule may also be employed. A method for quantifying a receptor protein and the like of the invention using an antibody of the invention is not particularly limited, and may be any method in which the amount of an antibody, antigen or antibody-antigen complex corresponding to the amount

of the antigen (for example, the amount of the receptor protein) in a test sample is detected physically and then a calculation is made based on a standard curve obtained by using the standard solutions containing known amounts of the antigen. For example, a nephrometry, a competitive assay, an immunometric assay and a sandwich assay can preferably be employed, with a sandwich assay described below being preferred in view of the sensitivity and the specificity.

[0241] A label employed in an assay using a labeled substance may for example be a radioisotope, an enzyme, a fluorescent substance, a luminescent substance and the like. Such radioisotope may for example be [ $^{125}\text{I}$ ], [ $^{131}\text{I}$ ], [ $^3\text{H}$ ], [ $^{14}\text{C}$ ] and the like. An enzyme described above is preferably one which is stable and has a high specific activity and may for example be  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase, alkaline phosphatase, peroxidase, malate dehydrogenase and the like. A fluorescent substance may for example be "FLUORESCAMINE", fluorescein isothiocyanate and the like. A luminescent substance may for example be luminol, a luminol derivative, luciferin, lucigenin and the like. A biotin-avidin system may also be employed for binding a label to an antibody or an antigen.

[0242] An insolubilization of an antigen or an antibody may be effected utilizing a physical adsorption, and a chemical binding employed usually for insolubilizing a protein or an enzyme may also be employed. A carrier may for example be an insoluble polysaccharide such as agarose, dextran and cellulose, a synthetic resin such as polystyrene, polyacrylamide and silicon, as well as a glass.

[0243] In a sandwich method, an insolubilized inventive monoclonal antibody is reacted with a test sample (primary reaction), and then another labeled monoclonal antibody of the invention is reacted (secondary reaction), and then the activity of the label on the insolubilized carrier is determined, whereby quantifying a receptor protein of the invention in the test sample. The primary reaction and the secondary reaction can be performed in the opposite order or may be performed simultaneously or at an interval. A label and a method for the insolubilization are as described above.

[0244] It is not always necessary in a sandwich immunoassay that an antibody employed as an antibody for a solid phase or an antibody for labeling is of a single type, and several antibodies can be employed as in a mixture for the purpose of a higher sensitivity of the measurement.

[0245] In a method for determining a receptor protein and the like by a sandwich method of the invention, monoclonal antibodies employed in the primary reaction and the secondary reaction are preferably those differing from each other in the site of the binding to the receptor protein and the like. Thus, the antibodies employed in the primary and secondary reactions are selected so that when the antibody employed in the secondary reaction recognizes the C-terminal of the receptor protein then the antibody employed in the primary reaction recognizes the sites other than the C-terminal, such as the N-terminal.

[0246] A monoclonal antibody can be used in an assay system other than a sandwich assay, such as a competitive assay, an immunometric assay and a nephrometry. In a competitive assay, an antigen in a test sample and a labeled antigen are reacted competitively with an antibody and then unreacted labeled antigen (F) is separated from an antibody-binding labeled antigen (B) (B/F separation), and the amount of the label on either B or F is determined, whereby quantifying the antigen in the test sample. This reaction is conducted by a liquid phase method employing a soluble antibody as an antibody and performing a B/F separation using a polyethylene glycol and a secondary antibody, and also by a solid phase method employing a solid phase antibody as a primary antibody or employing a soluble antibody as a primary antibody and a solid phase antibody as a secondary antibody.

[0247] In an immunometric method, an antigen in a test sample and a solid phase antigen are reacted competitively with a certain amount of a labeled antibody, and then the solid phase is separated from a liquid phase, or an antigen in a test sample is reacted with a labeled antibody in excess and then a solid phase antigen is added to bind an unreacted labeled antibody to the solid phase and subsequently the solid phase is separated from a liquid phase. Then the amount of the label in either phase is determined, whereby quantifying the antigen in the test sample.

[0248] In a nephrometric assay, the amount of an insoluble precipitate formed as a result of an antigen-antibody reaction in a gel or a solution is determined. Even when the amount of an antigen in a test sample is very small and only a small amount of a precipitation can be obtained, a laser nephrometry utilizing a scattering of the laser is preferably employed.

[0249] When applying each immunological assay described above to a quantification method of the invention, no particular condition or operation is specified. Ordinary conditions and operations in each method may be employed in combination with a technology known by those skilled in the art to construct an assay system for a receptor protein of the invention or a salt thereof. Such general technology is found in corresponding textbooks or guidebooks [for example, "Radioimmunoassay", ed. by H. Irie (KODANSHA, 1974), "Radioimmunoassay II", ed. by H. Irie (KODANSHA, 1979), "Enzyme Immunoassay", ed. by E. Ishikawa et al., (IGAKUSHOIN, 1978), "Enzyme Immunoassay", (2nd Volume), ed. by E. Ishikawa et al., (IGAKUSHOIN, 1982), "Enzyme Immunoassay", (3rd Volume), ed. by E. Ishikawa et al., (IGAKUSHOIN, 1987), "Methods in Enzymology", Vol. 70, (Immunochemical Techniques (Part A)), Vol. 73, (Immunochemical Techniques (Part B)), Vol. 74, (Immunochemical Techniques (Part C)), Vol. 84, (Immunochemical Techniques (Part D: Selected Immunoassays)), Vol. 92, (Immunochemical Techniques (Part E: Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods)), Vol. 121, (Immunochemical Techniques (Part I: Hybridoma Technology and Monoclonal An-

tibodies)), (Academic Press)).

[0250] As described above, a receptor protein of the invention or a salt thereof can be quantified at a high sensitivity by employing an antibody of the invention.

[0251] Furthermore, by quantifying a receptor protein of the invention or a salt thereof in vivo using an antibody of the invention, various diseases related to the dysfunction of the receptor protein of the invention can be diagnosed.

[0252] An antibody of the invention can also be employed for a specific detection of a receptor protein and the like of the invention which is present in a test sample such as a body fluid or a tissue. It can also be employed in preparing an antibody column used for purifying a receptor protein and the like of the invention, in detecting a receptor protein and the like of the invention in each fraction upon a purification, or in analyzing the behavior of a receptor protein and the like of the invention in a test cell.

(10) Method for screening compound capable of altering amount of receptor protein of the invention or partial peptide thereof in cell membrane

[0253] Since an antibody of the invention can specifically recognize a receptor protein or a partial peptide or a salt thereof, it can be used for screening for a compound altering the amount of the receptor protein or the partial peptide or the salt of the invention in a cell membrane.

[0254] Thus, the present invention provides, for example:

(i) a method for screening for a compound altering the amount of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane by destroying [1] blood, [2] a certain organ or [3] a tissue or a cell isolated from an organ of a non-human mammalian animal followed by isolating a cell membrane fraction followed by quantifying the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof contained in the cell membrane fraction;

(ii) a method for screening for a compound altering the amount of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane by destroying a transformant expressing the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof followed by isolating a cell membrane fraction followed by quantifying the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof contained in the cell membrane fraction;

(iii) a method for screening for a compound altering the amount of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane by cutting [1] blood, [2] a certain organ or [3] a tissue or a cell isolated from an organ of a non-human mammalian animal into sections followed by using an immunostaining method to quantify the staining of the receptor protein in the surface layer of the cell whereby identifying the protein on the cell membrane. Also provided is (iv) a method for screening for a compound altering the amount of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane by cutting a transformant expressing the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof into sections followed by using an immunostaining method to quantify the staining of the receptor protein in the surface layer of the cell whereby identifying the protein on the cell membrane.

[0255] Typically, the level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof contained in a cell membrane fraction is quantified as follows.

(i) A normal or a disease-bearing non-human mammalian model animal (for example, mouse, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like, more specifically, dementia rat, obesity mouse, arteriosclerosis rabbit, bile cancer mouse and the like) is treated with an agent (for example, anti-dementia agent, hypotensive agent, anti-cancer agent, anti-obesity agent and the like) or subjected to a mechanical stress (for example, flooding stress, electric shock, dark/light cycle, low temperature and the like), and after a certain time period, blood, a certain organ (for example, brain, liver, kidney and the like) or a tissue or a cell isolated from an organ is collected. The organ, tissue or cell thus obtained is suspended in a suitable buffer solution (for example, Tris-HCl buffer, phosphate buffer, Hepes buffer) where it is destroyed and then exposed to a surfactant (for example Triton X100™, Tween 20™) and then subjected to a centrifugation, a filtration or a column fractionation, whereby obtaining a cell membrane fraction.

A cell membrane fraction means a cell membrane-rich fraction obtained by a method known per se after pelletizing the cell. A cell may be pelletized for example by a method in which a cell is pressed and crushed by a Potter-Elvehjem homogenizer, by using a whirling blender or a polytron (Kinematica), by means of an ultrasonic treatment, or by a method in which a cell is sprayed via a fine nozzle while being pressurized by a French press.

A cell membrane may be fractionated mainly by a centrifugal fractionation such as a fractional centrifugation or a density gradient centrifugation. For example, a cell pellet is centrifuged at a low speed (500 rpm to 3000 rpm) for a short period (usually about 1 minutes to 10 minutes) to obtain a supernatant, which is then centrifuged at a higher speed (15000 rpm to 30000 rpm) usually for 30 minutes to 2 hours to obtain a pellet, which is used as a membrane

fraction. This membrane fraction contains a large amount of the membrane components such as an expressed receptor protein and phospholipids and membrane proteins derived from the cell.

A receptor protein or a partial peptide of the invention contained in a cell membrane fraction can be quantified for example by a sandwich immunoassay employing an antibody of the invention as well as western blotting.

Such sandwich immunoassay can be performed similarly to a method described above, while the western blotting can be performed by a method known per se.

(ii) A transformant which expresses a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof is prepared according to the method described above and the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof contained in a cell membrane fraction can be quantified and analyzed similarly.

**[0256]** A screening for a compound altering the level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane can be accomplished by:

(i) administering a test compound at a certain time point before (30 minutes to 24 hours, preferably 30 minutes to 12 hours, more preferably 1 hour to 6 hours before) or at a certain time point after (30 minutes to 3 days, preferably 1 hour to 2 days, more preferably 1 hour to 24 hours after) subjecting a normal or disease-bearing non-human mammalian model animal to a medication or a mechanical stress, or simultaneously with a medication or a mechanical stress, followed by quantifying the level of the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof contained in a cell at a certain time point after (30 minutes to 3 days, preferably 1 hour to 2 days, more preferably 1 hour to 24 hours after) the administration;

(ii) adding a test compound to a culture medium in which a transformant is incubated by a standard method followed by quantifying the level of the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof contained in a cell membrane at a certain time point after (1 day to 7 days, preferably 1 day to 3 days, more preferably 2 days to 3 days after) initiation of the incubation.

Typically, the level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof contained in a cell membrane fraction is determined as follows.

(iii) A normal or a disease-bearing non-human mammalian model animal (for example, mouse, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like, more specifically, dementia rat, obesity mouse, arteriosclerosis rabbit, bile cancer mouse and the like) is treated with an agent (for example, anti-dementia agent, hypotensive agent, anti-cancer agent, anti-obesity agent and the like) or subjected to a mechanical stress (for example, flooding stress, electric shock, dark/light cycle, low temperature and the like), and after a certain time period, blood, a certain organ (for example, brain, liver, kidney and the like) or a tissue isolated from an organ or a cell is collected. The organ, tissue or cell thus obtained is cut into sections by a standard method, and subjected to an immunostaining using an antibody of the invention. By quantifying the staining of the receptor protein in the surface layer of the cell to identify the protein on the cell membrane, a verification of the level of the receptor protein of the invention or the partial peptide thereof in the cell membrane is possible quantitatively and qualitatively.

(iv) A verification is possible also by subjecting a transformant expressing a receptor protein or a salt thereof to the similar procedure.

**[0257]** A compound or a salt thereof obtained by a screening method of the invention is a compound having an ability of altering the level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane, and typically it is (a) a compound which enhances a G-protein coupled receptor protein-mediated cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) by increasing the level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane, and (b) a compound which suppresses such cell stimulating activity by reducing the level of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane.

**[0258]** Such compound may for example be a peptide, a protein, a non-peptide compound, a synthetic compound, a fermented compound and the like, which may be novel compounds or known compounds.

**[0259]** A compound enhancing such cell stimulating activity is useful as a safe and pharmaceutical low in toxicity for enhancing the physiological activity of a receptor protein of the invention.

**[0260]** A compound suppressing such cell stimulating activity is useful as a safe and pharmaceutical low in toxicity for reducing the physiological activity of a receptor protein of the invention.

**[0261]** When a compound or a salt thereof obtained by a screening method of the invention is used in a pharmaceutical composition, a standard procedure may be followed. For example, similarly to a pharmaceutical containing a receptor protein of the invention, a dosage form such as tablet, capsule, elixir, microcapsule, aseptic solution or suspension can be formulated.

[0262] Since a formulation thus obtained is safe and low in toxicity, it can be administered to a human or a mammalian animal (for example, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like).

[0263] While such compound or a salt thereof may be given at a dose which varies depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, it can be given orally to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg. When it is given parenterally, the single dose may vary depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, and may for example be given as a formulation for injection to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 to 20 mg, more preferably about 0.1 to 10 mg, which is given advantageously by an intravenous injection. Also in other animals, a dose calculated for a 60 kg body weight may be administered.

(11) Preventing and/or treating agent against various diseases containing compound capable of altering amount of receptor protein of the invention or partial peptide, thereof in cell membrane

[0264] As described above, a receptor protein of the invention is considered to play some important in vivo role for example in central nervous function. Accordingly, a compound altering the amount of a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof in a cell membrane can be used as a preventing and/or treating agent against a disease related to the dysfunction of the receptor protein of the invention.

[0265] When such compound is used as a preventing and/or treating agent against a disease related to the dysfunction of a receptor protein of the invention, a standard formulation procedure may be followed.

[0266] For example, such compound may be given orally as an optionally sugar-coated tablet, capsule, elixir, microcapsule and the like, or parenterally as a formulation for injection such as an aseptic solution or suspension in water or pharmacologically acceptable liquid. For example, such formulation can be produced by mixing the compound with a known physiologically acceptable carrier, flavor, excipient, vehicle, preservative, stabilizer, binder and the like in a unit dosage form which is acceptable generally in pharmaceutical practice. The amount of the active ingredient in such formulation should be adjusted to achieve a suitable dose within a specified range.

[0267] An additive which may be incorporated into a tablet or a capsule may for example be a binder such as gelatin, corn starch, tragacanth, gum arabic and the like, an excipient such as crystalline cellulose, an expander such as corn starch, gelatin, alginic acid and the like, a lubricant such as magnesium stearate, a sweetener such as sucrose, lactose or saccharin, a flavor such as peppermint, oil of Geultheria ovatifolia spp., cherry and the like. When a unit dosage form is a capsule, a liquid carrier such as a fat may further be incorporated in addition to the materials described above. An aseptic formulation for injection can be prepared in accordance with ordinary pharmaceutical practice such as a dissolution or a suspension of an active ingredient, a naturally-occurring vegetable oil such as sesame oil and palm oil in a vehicle such as water for injection. An aqueous liquid for injection may for example be physiological saline, an isotonic solution containing glucose or other auxiliary agents (for example, D-sorbitol, D-mannitol, sodium chloride) and the like, which may be used in combination with a suitable solubilizer such as an alcohol (for example, ethanol), a polyalcohol (for example, propylene glycol, polyethylene glycol), a non-ionic surfactant (for example, polysorbate 80™, HCO-50). An oily liquid may for example be sesame oil and soybean oil, which may be used in combination with an solubilizer such as benzyl benzoate, benzyl alcohol and the like.

[0268] In addition, a preventing and/or treating agent described above may be supplemented also with a buffer agent (for example, phosphate buffer, sodium acetate buffer), a pain-ameliorating agent (for example, benzalkonium chloride, procaine hydrochloride), a stabilizer (for example, human serum albumin, polyethylene glycol), a preservative (for example, benzyl alcohol, phenol), an antioxidant. A formulation for injection thus prepared is then usually filled in a suitable ampoule.

[0269] Since a formulation thus obtained is safe and low in toxicity, it can be administered to a human or a mammalian animal (for example, rat, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like).

[0270] While such compound or a salt thereof may be given at a dose which varies depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, it can be given orally to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.1 mg to 100 mg, preferably about 1.0 to 50 mg, more preferably about 1.0 to 20 mg. When it is given parenterally, the single dose may vary depending on the patient to be treated, the target organ, the condition of the patient and the administration route, and may for example be given as a formulation for injection to an adult (60 kg) usually at a daily dose of about 0.01 mg to 30 mg, preferably about 0.1 to 20 mg, more preferably about 0.1 to 10 mg, which is given advantageously by an intravenous injection. Also in other animals, a dose calculated for a 60 kg body weight may be administered.

(12) Neutralization of receptor protein of the invention or partial peptide thereof or salt thereof by antibody

[0271] The neutralizing activity of an antibody against a receptor protein of the invention or a partial peptide thereof



or a salt thereof means an activity by which a signal transmission function involving such receptor protein and the like is inactivated. Accordingly, when such antibody has a neutralizing activity, a signal transmission involving such receptor protein, such as the receptor protein-mediated cell stimulating activity (for example, an activity which promotes or suppresses arachidonic acid release, acetylcholin release, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release, intracellular cAMP production, intracellular cGMP production, inositol phosphate production, cell membrane potential variation, intracellular protein phosphorylation, c-fos activation, pH reduction and the like) can be inactivated. As a result, an application to the prevention and/or the treatment of a disease caused for example by an overexpression of such receptor protein is possible.

(13) Creation of non-human animal having DNA encoding G-protein coupled receptor protein of the invention

[0272] A transgenic non-human animal expressing a receptor protein and the like of the invention can be created using a DNA of the invention. Such non-human animal may for example be a mammalian animal (for example, rat, mouse, rabbit, sheep, swine, cattle, cat, dog, monkey and the like) and the like (hereinafter abbreviated as an animal), with mouse and rabbit being preferred particularly.

[0273] When a DNA of the invention is transferred to a target animal, a use as a gene construct bound downstream of a promoter capable of expressing such DNA in an animal cell is usually advantageous. When a DNA of the invention which is derived for example from a rabbit is to be transferred, a gene construct bound downstream of any promoter capable of expressing a DNA of the invention derived from an animal having a high homology thereto in an animal cell is microinjected for example to a fertilized ovum of a rabbit to create a DNA transfer animal producing a receptor protein and the like of the invention at a high level. While such promoter may for example be a ubiquitous expression promoter such as virus-derived promoter and metallothioneine, an NGF gene promoter expressing specifically in a brain or an enolase gene promoter are employed preferably.

[0274] The transfer of a DNA of the invention at the stage of a fertilized ovum is preserved to be present throughout the entire embryonic and somatic cells in a target animal. The presence of a receptor protein and the like of the invention in an embryonic cell of a created animal after the DNA transfer means that the entire descendants of the created animal will have the receptor protein and the like of the invention in their embryonic and somatic cells. Thus, a descendant of this species taking over this gene will have the receptor protein and the like of the invention in all of its embryonic and somatic cells.

[0275] A DNA transfer animal of the invention, once ensuring a stable preservation of the gene even after a mating, can be subjected as a relevant DNA-possessing animal to a hereditary breeding under an ordinary breeding condition. Furthermore, by mating the animals of the both sexes each having an intended DNA, a homozygote animal having the transduced genes in the both of their homologous chromosomes can be obtained, and then by mating the animals of the both sexes thus obtained a hereditary breeding to allow all descendants to have the relevant DNA is possible.

[0276] Since an animal to which a DNA of the invention has been transferred allows a receptor protein and the like of the invention to be highly expressed, it is useful as an animal for screening for an agonist or an antagonist for the receptor protein and the like of the invention.

[0277] A DNA transfer animal of the invention can be used also as a cell source for a tissue culture. For example, by analyzing a DNA or an RNA in a tissue of a DNA transfer mouse of the invention directly or analyzing a tissue having a receptor protein of the invention expressed by the gene, the receptor protein and the like of the invention can be investigated. A cell of a tissue having a receptor protein of the invention is incubated by a standard tissue culture technology and used to investigate the function of a cell from a tissue which is generally difficult to be incubated, such as a brain and a peripheral tissue. Also by using such cell, a pharmaceutical capable of promoting the function of each tissue can be selected. Furthermore, a receptor protein and the like of the invention can be isolated and purified from a highly expressing cell.

[0278] In the specification and the drawings, a base or an amino acid may be designated as a code based on IUPAC-IUB, Commission on Biological Nomenclature or as a customary abbreviation in the art as exemplified below. When an amino acid is present as an optical isomer, it is in L form unless otherwise specified.

DNA : Deoxyribonucleic acid

cDNA : Complementary deoxyribonucleic acid

A : Adenine

T : Thymine

G : Guanine

C : Cytosine

RNA : Ribonucleic acid

mRNA : Messenger ribonucleic acid

dATP : Deoxyadenosine triphosphate

dTTP : Deoxythymidine triphosphate

	dGTP :	Deoxyguanosine triphosphate
	dCTP :	Deoxycytidine triphosphate
	ATP :	Adenosine triphosphate
	EDTA :	Ethylenediamine tetraacetic acid
5	SDS :	Sodium dodecylsulfate
	Gly :	Glycine
	Ala :	Alanine
	Val :	Valine
	Leu :	Leucine
10	Ile :	Isoleucine
	Ser :	Serine
	Thr :	Threonine
	Cys :	Cysteine
	Met :	Methionine
15	Glu :	Glutamic acid
	Asp :	Aspartic acid
	Lys :	Lysine
	Arg :	Arginine
	His :	Histidine
20	Phe :	Phenylalanine
	Tyr :	: Tyrosine
	Trp :	Tryptophan
	Pro :	Proline
	Asn :	Asparagine
25	Gln :	Glutamine
	pGlu :	Pyroglutaminic acid
	Me :	Methyl group
	Et :	Ethyl group
	Bu :	Butyl group
30	Ph :	Phenyl group
	TC :	Thiazolidine-4 (R) -carboxamide group

**[0279]** Substituents, protective groups and reagents employed frequently in the specification are represented by the following codes.

35	Tos	p-Toluenesulfonyl
	CHO :	Formyl
	Bzl :	Benzyl
	Cl <sub>2</sub> Bzl :	2,6-Dichlorobenzyl
40	Bom :	Benzyloxymethyl
	Z :	Benzyloxycarbonyl
	Cl-Z :	2-Chlorobenzyloxycarbonyl
	Br-Z :	2-Bromobenzyloxycarbonyl
	Boc :	t-Butoxycarbonyl
45	DNP :	Dinitrophenyl
	Trt :	Trityl
	Bom :	t-Butoxymethyl
	Fmoc :	N-9-Fluorenylmethoxycarbonyl
	HOBT :	1-Hydroxybenzotriazole
50	HOObt :	3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxo-1,2,3-benzotriazine
	HONB :	1-Hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboxyimide
	DCC :	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide

**[0280]** The SEQ. ID. No. in the sequence listing in this specification represent the following sequences.

55  
[SEQ ID NO.1]

**[0281]** SEQ ID NO.1 represents an amino acid sequence of a human hippocampus-derived novel G-protein coupled



receptor protein H7TMB56 of the invention.

[SEQ ID NO.2]

- 5 [0282] SEQ ID NO.2 represents a base sequence of a cDNA encoding a human hippocampus-derived novel G-protein coupled receptor protein H7TMB56 of the invention having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1.

[SEQ ID NO.3]

10

- [0283] SEQ ID NO.3 represents a base sequence of a cDNA encoding a human hippocampus-derived novel G-protein coupled receptor protein H7TMB56 of the invention having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1.

15

[SEQ ID NO.4]

- [0284] SEQ ID NO.4 represents a base sequence of Primer 1 employed for cloning a cDNA encoding a human hippocampus-derived novel G-protein coupled receptor protein H7TMB56 of the invention.

20

[SEQ ID NO.5]

- [0285] SEQ ID NO.5 represents a base sequence of Primer 2 employed for cloning a cDNA encoding a human hippocampus-derived novel G-protein coupled receptor protein H7TMB56 of the invention.

25

[SEQ ID NO.6]

- [0286] SEQ ID NO.6 represents an amino acid sequence of a human hippocampus-derived novel G-protein coupled receptor protein H7TMB56 of the invention.

30

[SEQ ID NO.7]

- [0287] SEQ ID NO.7 represents a base sequence of a cDNA encoding a G-protein coupled receptor protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.6.

35

- [0288] A transformant *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ /pCRII-H7TMB56 obtained in Example 1 described below has been deposited to National Institute of Bioscience and Human Technology of Agency of Industrial Science and Technology of the Ministry of International Trade and Industry (NIBH) on September 4, 1998 under the deposition number FERM BP-6483 and also to Institute for Fermentation (IFO) on June 19, 1998 under the deposition No.IFO 16186.

40

- [0289] The present invention is further described in detail in the following Examples, which are not intended to restrict the invention. A gene engineering procedure employing *E.coli* was in accordance with the methods described in Molecular Cloning.

Example 1 Cloning and base sequencing of cDNA encoding human hippocampus-derived G-protein coupled receptor protein (1)

45

- [0290] A PCR was performed using a human hippocampus cDNA (Marathon-Ready™ cDNA, CLONTECH) as a template together with two primers, namely, Primer 1 (SEQ ID NO.4) and Primer 2 (SEQ ID NO.5). The reaction mixture in this PCR contained a 1/10 volume of the cDNA described above as a template, a 1/50 volume of Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH), each 0.2  $\mu$ M of Primer 1 (SEQ ID NO.4) and Primer 2 (SEQ ID NO.5), 200  $\mu$ M of dNTPs together with a buffer attached to the enzyme, in the total volume of 25  $\mu$ L. The PCR involved [1] 1 minute at 95°C, [2] three cycles of 20 seconds at 94°C followed by 2 minutes at 72°C, [3] three cycles of 20 seconds at 94°C followed by 2 minutes at 68°C, [4] 38 cycles of 20 seconds at 94°C followed by 20 seconds at 63.5°C followed by 2 minutes and 20 seconds at 68°C and [5] a final chain elongation for 7 minutes at 68°C. After this PCR, the reaction product was subcloned to a plasmid vector pCRII (INVITROGEN) according to the instruction attached to a TA cloning kit (INVITROGEN). The vector was then transduced into *E.coli* DH5 $\alpha$ , and a clone having a cDNA was screened for in an LB agar medium containing ampicillin, and then each clone was sequenced to obtain a cDNA sequence (SEQ ID Nos.2 and 3) encoding a novel G-protein coupled receptor protein. A novel G-protein coupled receptor protein containing the amino acid sequence (SEQ ID NO.1) derived from this cDNA was designated as H7TMB56.

55

- [0291] A plasmid pCRII-H7TMB56 subcloned with a cDNA (SEQ ID NO.2) encoding a human hippocampus-derived

G-protein coupled receptor protein H7TMB56 of the invention was transduced into *E. coli* DH5 $\alpha$  by a method known per se to obtain a transformant *E. coli* DH5 $\alpha$ / pCRII-H7TMB56.

Example 2 Cloning and base sequencing of cDNA encoding human hippocampus-derived G-protein coupled receptor protein (2)

[0292] A PCR was performed using a human hippocampus cDNA (Marathon-Ready™ cDNA, CLONTECH) as a template together with two primers, namely, Primer 1 (SEQ ID NO.4) and Primer 2 (SEQ ID NO.5). The reaction mixture in this PCR contained a 1/10 volume of the cDNA described above as a template, a 1/50 volume of Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH), each 0.2  $\mu$ M of Primer 1 (SEQ ID NO.4) and Primer 2 (SEQ ID NO.5), 200  $\mu$ M of dNTPs together with a buffer attached to the enzyme, in the total volume of 25  $\mu$ L. The PCR involved [1] 1 minute at 95°C, [2] three cycles of 20 seconds at 94°C followed by 2 minutes at 72°C, [3] three cycles of 20 seconds at 94°C followed by 2 minutes at 68°C, [4] 38 cycles of 20 seconds at 94°C followed by 20 seconds at 63.5°C followed by 2 minutes and 20 seconds at 68°C and [5] a final chain elongation for 7 minutes at 68°C. After this PCR, the reaction product was subcloned to a plasmid vector pCRII (INVITROGEN) according to the instruction attached to a TA cloning kit (INVITROGEN). The vector was then transduced into *E. coli* DH5 $\alpha$ , and a clone having a cDNA was screened for in an LB agar medium containing ampicillin, and then each clone was sequenced to obtain a cDNA sequence (SEQ ID No.7) encoding a novel G-protein coupled receptor protein. A novel G-protein coupled receptor protein-containing the amino acid sequence (SEQ ID NO.6) derived from this cDNA was designated as H7TMB56.

Example 3 Cloning and base sequencing of cDNA encoding human genome-derived G-protein coupled receptor protein (1)

[0293] A PCR was performed using a human genome DNA (about 1 ng/ $\mu$ L) as a template together with two primers, namely, Primer 1 (SEQ ID NO.4) and Primer 2 (SEQ ID NO.5). The reaction mixture in this PCR contained a 1/25 volume of the genome DNA described above as a template, a 1/50 volume of Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH), each 0.2  $\mu$ M of Primer 1 (SEQ ID NO.4) and Primer 2 (SEQ ID NO.5), 200  $\mu$ M of dNTPs together with a buffer attached to the enzyme, in the total volume of 25  $\mu$ L. The PCR involved [1] 1 minute at 94°C, [2] four cycles of 20 seconds at 94°C followed by 2 minutes at 72°C, [3] four cycles of 20 seconds at 94°C followed by 2 minutes at 70°C, [4] 27 cycles of 20 seconds at 94°C followed by 2 minutes at 68°C and [5] a final chain elongation for 7 minutes at 68°C. After this PCR, the reaction product was subcloned to a plasmid vector pCRII (INVITROGEN) according to the instruction attached to a TA cloning kit (INVITROGEN). The vector was then transduced into *E. coli* DH5 $\alpha$ , and a clone having a genome fragment was screened for in an LB agar medium containing ampicillin, and then each clone was sequenced to ensure that the base sequence was identical to the DNA sequences (SEQ ID NOs. 2, 3 and 7) each encoding a novel G-protein coupled receptor protein obtained in Examples 1 and 2.

Example 4 Preparation of H7TMB56- and H7TMB56C-expressing CHO cell

[0294] Similarly to Example 1, a plasmid pCRII-H7TMB56 subcloned with a cDNA (SEQ ID NO.7) encoding H7TMB56C was transduced into *E. coli* DH5 $\alpha$  by a method known per se to obtain a transformant *E. coli* DH5 $\alpha$ / pCRII-H7TMB56C.

[0295] A transformant *E. coli* DH5 $\alpha$ / pCRII-H7TMB56 obtained in Example 1 or a transformant *E. coli* DH5 $\alpha$ / pCRII-H7TMB56C was incubated and then PLASMIDMIDKIT (QUIAGENE) was employed to prepare a plasmid DNA of pCRII-H7TMB56 or pCRII-H7TMB56C. From each of these plasmids, a cDNA encoding a G-protein coupled receptor protein H7TMB56 or H7TMB56C of the invention was cloned to a protein-expressing plasmid vector pcDNA3.1/V5/His to construct a protein-expressing plasmid pcDNA3.1-H7TMB56 or -H7TMB56C. The plasmid thus obtained was subjected to PLASMIDMIDKIT (QUIAGENE) to produce a large amount of the plasmid DNA, which was then transduced into a CHO dhfr- cell using CELLFECT TRANSFECTION KIT (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) according to the protocol attached thereto. Thus, 10 mg of the DNA was co-suspended with calcium phosphate and added to a 10 cm petri dish inoculated 24 hours ago with  $5 \times 10^5$  or  $1 \times 10^6$  CHO dhfr- cells, and incubated for one day in a MEM $\alpha$  medium supplemented with 10 % fetal calf serum and then subcultured and then incubated in a selection medium which was a MEM $\alpha$  medium supplemented with 0.4mg/ml G418 (GIBCO BRL) and 10 % dialyzed fetal calf serum. By selecting a colony of a transformant cell (CHO/H7TMB56 or CHO/H7TMB56C) growing in the selection medium, a H7TMB56- or H7TMB56C-expressing CHO cell was obtained.

[0296] After extracting a total RNA from the selected H7TMB56-expressing CHO cell by a standard method, the amount of the mRNA of H7TMB56 was determined and the number of the copies was calculated by a TaqMan method. The results are shown below.

Table 1

Clone No	Expression level (copy/ng total RNA)	
	1st measurement	2nd measurement
7	83046	89931
	104954	71409
9	32632	30669
	61153	28487
15	5146	7970
	7172	4882

### Industrial Applicability

[0297] A G-protein coupled receptor protein of the invention or a salt thereof, a partial peptide and a salt thereof, and a polynucleotide encoding such G-protein coupled receptor protein or a partial peptide thereof (for example, DNA, RNA or its derivative) is useful in [1] determining a ligand (agonist), [2] obtaining an antibody and an antiserum, [3] constructing a recombinant receptor protein expression system, [4] developing a receptor binding assay system and screening for a pharmaceutical candidate compound using this expression system, [5] designing a drug based on the comparison with a structurally-related ligand/receptor, [6] a reagent for preparing a probe or a PCR primer in a gene diagnosis, [7] creating a transgenic animal, or [8] a pharmaceutical such as a genetically preventing or treating agent.

### Claims

1. A G-protein coupled receptor protein comprising an amino acid sequence identical or substantially identical to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1 or a salt thereof.
2. A G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 wherein an amino acid sequence substantially identical to the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.1 is the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 6 or a salt thereof.
3. A partial peptide of a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a salt thereof.
4. A polynucleotide comprising a polynucleotide having a base sequence encoding a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1.
5. A polynucleotide according to Claim 4 which is a DNA.
6. A polynucleotide according to Claim 4 having the base sequence represented by SEQ ID NO.2 or SEQ ID NO.3.
7. A polynucleotide according to Claim 4 comprising a polynucleotide having a base sequence encoding a G-protein coupled receptor protein comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO.6.
8. A polynucleotide according to Claim 7 which is a DNA.
9. A polynucleotide according to Claim 7 having the base sequence represented by SEQ ID NO.7.
10. A recombinant vector comprising a polynucleotide according to Claim 4.
11. A transformant transformed with a recombinant vector according to Claim 10.
12. A method for producing a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a salt thereof comprising incubating a transformant according to Claim 11 to produce a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1.

13. An antibody directed to a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a partial peptide according to Claim 3 or a salt thereof.
- 5 14. An antibody according to Claim 13 which is a neutralizing antibody which inactivates the signal transmission of a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1.
15. A diagnostic agent comprising an antibody according to Claim 13.
- 10 16. A ligand for a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a salt thereof obtained by using a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a partial peptide according to Claim 3 or a salt thereof.
17. A pharmaceutical comprising a ligand for a G-protein coupled receptor protein according to Claim 16.
- 15 18. A method for determining a ligand for a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a salt thereof comprising using a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a partial peptide according to Claim 3 or a salt thereof.
- 20 19. A method for screening for a compound or a salt thereof which is capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a salt thereof comprising using a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a partial peptide according to Claim 3 or a salt thereof.
- 25 20. A kit for screening for a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a salt thereof comprising using a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a partial peptide according to Claim 3 or a salt thereof.
- 30 21. A compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a salt thereof which can be obtained by using a screening method according to Claim 19 or a screening kit according to Claim 20.
- 35 22. A pharmaceutical comprising a compound or a salt thereof capable of altering the binding affinity between a ligand and a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 or a salt thereof which can be obtained by using a screening method according to Claim 19 or a screening kit according to Claim 20.
- 40 23. A polynucleotide capable of being hybridized with a polynucleotide according to Claim 4 under a high stringent condition.
- 45 24. A polynucleotide comprising a base sequence or a part thereof which is complementary with a polynucleotide according to Claim 4.
- 50 25. A method for quantifying an mRNA of a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 comprising using a polynucleotide according to Claim 4 or a part thereof.
- 55 26. A method for quantifying a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 comprising using an antibody according to Claim 13.
27. A method for diagnosing a disease related to a function of a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 comprising using a quantification method according to Claim 25 or Claim 26.
28. A method for screening for a compound or a salt thereof capable of altering the expression level of a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 comprising using a quantification method according to Claim 25.
29. A method for screening for a compound or a salt thereof capable of altering the amount of a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 in a cell membrane comprising using a quantification method according to Claim 26.
30. A compound or a salt thereof capable of altering the expression level of a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 which can be obtained by using a screening method according to Claim 28.

31. A compound or a salt thereof capable of altering the amount of a G-protein coupled receptor protein according to Claim 1 in a cell membrane which can be obtained by using a screening method according to Claim 29:

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Figure 1

Parameter : Kyte & Doolittle  
Range to Average : 15

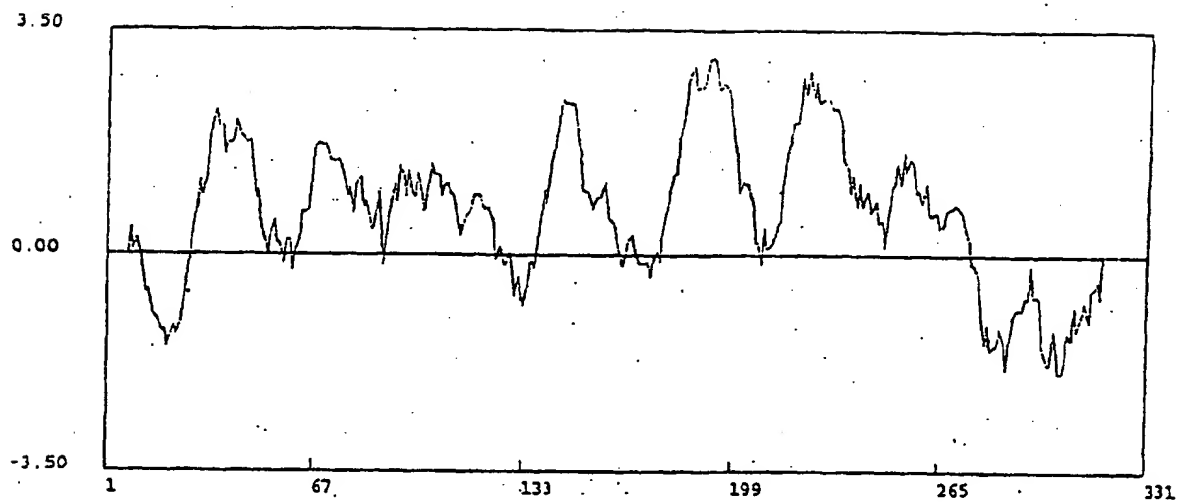


Figure 2

37 ISLVGLTGNVVLWLLGYRMRRNAVSIYILNLAAAD..FLFLSFQIIRSP 84  
 || :||: |::||:| :|||| :|| :|: || :|| | |:  
 41 ISPLGFVENGILLWFLCFMRMRNPFTVYITHLSIADISLLFCIF.ILSID 89  
 85 LRL...INISHLIRKILVSV.MTFPYFTGLSMLSAISTERCLSVLWPIWY 130  
 | : :| : :|| : | | || :|:||||:||||||:||||  
 90 YALDYELSSGHYYTIVTLSVTFLFGYNTGLYLLTAISVERCLSVLYPIWY 139  
 131 RCRRPHTLSAVVCVLLWGLSLLFSMLEWRFCDFLFGADSSWCETSD... 177  
 ||:|| | || ||:|||||| | : :|: :| : || :| : ||  
 140 RCHRPKHQSAFVCALLWALSCLVTTMEYVMC..IDSGEESH..SQSDCRA 185  
 178 ...FIPVAWLIFLCVVLVSSLVLLVRILCGSRKMPLTRLYVTILLTVLV 224  
 || : : : : : ||| :|:|:| : : :||:|:|:|:|:|:  
 186 VIIFIAILSFLVFTPLMLVSSTILVVKIRKNTWASHSSKLYIVIMVT||| 235  
 225 FLLCGLPFGILGALIY.....RMHLNLEVLYCHVYLVCMSSSLNSSA 267  
 ||: :|: :| | | : :| |::|: : : |::|||  
 236 FLIFAMPMRVLYLLYYEYWSTFGNLH.NISLLF.....STINSSA 274  
 268 NP||YFFVGSRQRQRQNLKLVLRALQDKPEVDKGEGQLPEESLE 314  
 ||:||||||| : : :|:|:| ||:|: : : ||: : |:  
 275 NPFIYFFVGSSKKKRFRESLKVVLTRAFKDEMQRPRRQEGNCNTYSIE 321

Figure 3

1 ATGGATCCAACCGTCCCAGTCTTGGGTACAAAAGTACACCAATCAACGGACGTGAGGAG 60  
 MetAspProThrValProValLeuGlyThrLysLeuThrProIleAsnGlyArgGluGlu

61 ACTCCTTGCTACAAGCAGACCCTGAGCTTCACGGTGCTGACGTGCATCATTTCCCTTGTC 120  
 ThrProCysTyrLysGlnThrLeuSerPheThrValLeuThrCysIleIleSerLeuVal

121 GGACTGACAGGAAACGCGGTTGTGCTCTGGCTCCTGGGCTGCCGCATGCCGAGGAACGCT 180  
 GlyLeuThrGlyAsnAlaValValLeuTrpLeuLeuGlyCysArgMetArgArgAsnAla

181 GTCTCCATCTACATCCTCAACCTGGCCGCAGCAGACTTCCTCTTCCTCAGCTTCAGATT 240  
 ValSerIleTyrIleLeuAsnLeuAlaAlaAlaAspPheLeuPheLeuSerPheGlnIle

241 ATACGTTCCGCATTACGCCTCATCAATATCAGCCATCTCATCCGCAAATCCTCGTTTCT 300  
 IleArgSerProLeuArgLeuIleAsnIleSerHisLeuIleArgLysIleLeuValSer

301 GTGATGACCTTTCCTACTTTACAGGCCTGAGTATGCTGAGCGCCATCAGCACCGAGCGC 360  
 ValMetThrPheProTyrPheThrGlyLeuSerMetLeuSerAlaIleSerThrGluArg

361 TGCCTGTCTGTTCTGTGGCCCATCTGGTACCGCTGCCGCCGCCACACACCTGTCAGCG 420  
 CysLeuSerValLeuTrpProIleTrpTyrArgCysArgArgProThrHisLeuSerAla

421 GTCGTGTGTGCTGCTCTGGGGCCTGTCCCTGCTGTTTAGTATGCTGGAGTGGAGGTTT 480  
 ValValCysValLeuLeuTrpGlyLeuSerLeuLeuPheSerMetLeuGluTrpArgPhe



Figure 4

481 TGTGACTTCCTGTTTAGTGGTGCTGATTCTAGTTGGTGTGAAACGTCAGATTTTCATCCCA 540  
 CysAspPheLeuPheSerGlyAlaAspSerSerTrpCysGluThrSerAspPheIlePro

541 GTCGGGTGGCTGATTTTTTATGTGTGGTTCTCTGTGTTCCAGCCTGGTCCTGCTGGTC 600  
 ValAlaTrpLeuIlePheLeuCysValValLeuCysValSerSerLeuValLeuLeuVal

601 AGGATCCTCTGTGGATCCCGGAAGATGCCGCTGACCAGGCTGTACGTGACCATCCTGCTC 660  
 ArgIleLeuCysGlySerArgLysMetProLeuThrArgLeuTyrValThrIleLeuLeu

661 ACAGTGCTGGTCTTCCTCCTCTGCGGCCTGCCCTTCGGCATTCTGGGGGCCCTAATTTAG 720  
 ThrValLeuValPheLeuLeuCysGlyLeuProPheGlyIleLeuGlyAlaLeuIleTyr

721 AGGATGCACCTGAATTTGGAAGTCTTATATTGTCATGTTTATCTGGTTTGCATGTCCCTG 780  
 ArgMetHisLeuAsnLeuGluValLeuTyrCysHisValTyrLeuValCysMetSerLeu

781 TCCTCTCTAAACAGTAGTGCCAACCCCATCATTTACTTCTTGGTGGGCTCCTTTAGGCAG 840  
 SerSerLeuAsnSerSerAlaAsnProIleIleTyrPhePheValGlySerPheArgGln

841 CGTCAAAATAGGCAGAACCTGAAGCTGGTTCTCCAGAGGGCTCTGCAGGACAAGCCTGAG 900  
 ArgGlnAsnArgGlnAsnLeuLysLeuValLeuGlnArgAlaLeuGlnAspLysProGlu

901 GTGGATAAAGGTGAAGGGCAGCTTCCTGAGGAAAGCCTGGAGCTGTGGGAAGCAGATTG 960  
 ValAspLysGlyGluGlyGlnLeuProGluGluSerLeuGluLeuSerGlySerArgLeu

961 GGGCCATGA 969  
 GlyPro\*\*\*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05365

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl. <sup>7</sup> C07K14/705, 16/28, C12N1/21, 15/12, C12P21/02, G01N33/68, A61K38/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>7</sup> C07K14/00-14/825, C12N15/11-15/62		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Cell, Vol. 45, No. 5, issued 06 June, 1986, Dallan Young et al., "Isolation and Characterization of a New Cellular Oncogene Encoding a Protein with Multiple Potential Transmembrane Domains", pages 711-719	24 1-23, 25, 26, 28-31
X A	Molecular Endocrinology, Vol. 6, No. 12, issued December, 1992, Yuichiro Yamada et al., "Somatostatin Receptors, an Expanding Gene Family: Cloning and Functional Characterization of Human SSTR3, a Protein Coupled to Adenylyl Cyclase", pages 2136-2142	24 1-23, 25, 26, 28-31
X A	FEBS Letters, Vol. 321, Nos. 2,3, issued 26 April, 1993, Jacques D. Corness et al., "A human somatostatin receptor (SSTR3), located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptides", pages 279-284	24 1-23, 25, 26, 28-31
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 11 January, 2000 (11.01.00)		Date of mailing of the international search report 25 January, 2000 (25.01.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05365

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 89, No. 1, issued 01 January, 1992, Yuichiro Yamada et al., "Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney", pages 251-255	24 1-23, 25, 26, 28-31
A	Molecular Endocrinology, Vol. 5, No. 10, issued October, 1991, C. Monnot et al., "Cloning and Functional Characterization of a Novel mas-Related Gene, Modulating Intracellular Angiotensin II Actions", pages 1477-1487	1-26, 28-31
A	Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 85, No. 14, issued July 1988, Dallen Young et al., "Characterization of the rat mas oncogene and its high-level expression in the hippocampus and cerebral cortex of rat brain", pages 5339-5342	1-26, 28-31
A	WO, 96/16087, A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 30 May, 1996 (30.05.96) & AU, 9515501, A & ZA, 9409667, A & EP, 871667, A1 & JP, 10-509870, A	1-26, 28-31

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05365

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claim 27 relates to a method for diagnosis of the human body.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1992)